

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München



**Modulation der Zellmigration durch
Connexin 43: der Einfluss von
Proteininteraktions- und
Phosphorylierungsstellen**

Felizitas Viktoria Kiemer

aus Starnberg, Deutschland

2020

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 7 der Promotionsordnung vom 28. November 2011 von Herrn Professor em. Dr. Ulrich Pohl betreut und von Frau Professor Dr. Angelika Vollmar von der Fakultät für Chemie und Pharmazie vertreten.

Eidesstattliche Versicherung

Diese Dissertation wurde eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 17.06.2020

Felizitas Kiemer

Dissertation eingereicht am: 17.06.2020

1. Gutachter: Prof. Dr. Angelika Vollmar
2. Gutachter: Prof. em. Dr. Ulrich Pohl

Mündliche Prüfung am: 19.10.2020

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungen	VIII
I Einleitung.....	1
1 Zellmigration	1
1.1 Reorganisation des Aktinzytoskeletts	1
2 Connexine und Gap Junctions	4
3 Connexin 43.....	7
3.1 Der Lebenszyklus von Cx43	7
3.2 Posttranslationale Modifikationen von Cx43	8
3.3 Die Rolle von Cx43 bei der Zellmigration.....	10
3.4 Interaktionspartner von Cx43.....	13
3.4.1 Src	15
3.4.2 PKA	16
3.4.3 VASP	18
3.4.4 IRSp53.....	20
4 Zielsetzung.....	21
II Material und Methoden.....	22
1 Material	22
1.1 Laborausstattung	22
1.2 Plastikware/ Verbrauchsmaterial	23
1.3 Chemikalien	25
1.4 Zellkultur	26

1.5 Primärantikörper	27
1.6 Sekundärantikörper.....	28
1.7 Plasmide	29
1.8 Primer	30
1.9 Kits.....	30
2 Methoden	31
2.1 Zellbiologische Methoden	31
2.1.1 Zelllinien	31
2.1.2 Zellpassage	32
2.1.3 Einfrieren	33
2.1.4 Auftauen	33
2.1.5 Transfektion.....	33
2.1.6 Migrationsanalyse.....	34
2.1.7 Golgi-Orientierung	36
2.1.8 Messung der Gap Junction-Kopplung über die interzelluläre Ca^{2+} - Ausbreitung	37
2.1.9 F-Aktin-Färbung und Bestimmung der Filopodienanzahl.....	38
2.2 Molekularbiologische Methoden	38
2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)	38
2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA	39
2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	41
2.2.4 Reinigung der DNA-Fragmente	42
2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	42
2.2.6 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen.....	43
2.2.7 Ligation	43
2.2.8 Transformation.....	43
2.2.9 Plasmidisolierung.....	44

2.2.10 Sequenzierung.....	44
2.3 Proteinbiochemie	45
2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen.....	45
2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	45
2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	45
2.3.4 Western Blot (Semi Dry Blotting und Proteindetektion)	46
2.3.5 Entfernen gebundener Antikörper von der Membran (Stripping)	47
2.3.6 Immunpräzipitation	47
2.4 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie	48
2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung	48
2.4.2 Konfokale Mikroskopie.....	49
2.5 Statistik	49
III Ergebnisse	51
1 Stabile Expression von mutierten Cx43 Proteinen in HeLa-Zellen und deren funktionelle Charakterisierung.....	51
1.1 Expression und zelluläre Lokalisation der Cx43-Mutanten	51
1.2 Einfluss der Cx43-Mutationen auf die GJ-Kopplung	55
1.4 Auswirkungen der Cx43-Mutationen auf die Zellmigration.....	56
1.5 Einfluss der Cx43-Mutationen auf die Filopodienbildung	61
2 Rolle der PKA für die Cx43-vermittelte Migrationssteigerung	64
2.1 Auswirkungen der Aktivierung bzw. Inhibierung von PKA auf die Zellmigration	64
2.2 Die Aktivierung der PKA reduzierte die Filopodienbildung von Cx43-exprimierenden Zellen	67
2.3 Einfluss der PKA-Phosphorylierungsstellen auf Cx43-Interaktionen mit PKA, VASP und IRSp53	69
2.5 Verstärkte VASP-Phosphorylierung in Cx43-exprimierenden Zellen nach PKA-Aktivierung.....	75

IV Diskussion.....	79
1 Expression der Cx43-Mutanten.....	79
2 Die Migrationssteigerung von Cx43 wird durch die SH2- und SH3-Bindedomäne vermittelt	80
3 Die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen führt zur Reduktion der Direktionalität	82
4 PKA reduziert die Cx43-vermittelte Zellmigration.....	84
V Zusammenfassung	93
VI Literaturverzeichnis.....	95
Publikationen und Konferenzbeiträge.....	111
Danksagung	112

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Darstellung des Filopodienaufbaus während der Zellmigration.....	4
Abb. 2: Connexinstruktur und Aufbau von Gap Junctions	6
Abb. 3: Phosphorylierungsstellen der C-terminalen Domäne von Cx43.....	10
Abb. 4: Darstellung des Signalwegs, wie Cx43 zur vermehrten Filopodienbildung und Migration beiträgt.....	13
Abb. 5: Bindungsstellen für Interaktionspartner sowie für SH2- und SH3-Domänen und Phosphorylierungsstellen von Cx43	15
Abb. 6: Anwendung der Silikon-Inserts (Ibidi).....	36
Abb. 7: Zelluläre Lokalisation der Cx43-Mutanten in HeLa-Zellen.....	54
Abb. 8: Western Blot Analyse der Expression der Cx43-Mutanten in stabil transfizierten HeLa Zellen.....	54
Abb. 9: Gap Junction-vermittelte Ca^{2+} -Ausbreitung in HeLa Cx43 und HeLa Cx43-Mutanten	56
Abb. 10: Migration von HeLa Cx43 und HeLa Cx43-Mutanten im Wundassay	58
Abb. 11: Migration von HeLa-Zellen bei Inhibierung von Src	59
Abb. 12: Cx43-PKA führt zu einer gesteigerten, aber ungerichteten Migration in HeLa-Zellen.....	60
Abb. 13: Golgi-Orientierung in migrierenden Zellen..	61
Abb. 14: Filopodienbildung von HeLa Zellen, die Cx43 oder mutierte Cx43-Proteine exprimieren	64
Abb. 15: Migration (akkumulierten Distanz) von HeLa-Zellen bei Aktivierung der PKA durch FSK	65
Abb. 16: Migration (akkumulierten Distanz) von HeLa-Zellen bei Inhibierung der PKA durch den Inhibitor PKI.....	66
Abb. 17: Analyse der Direktionalität von HeLa-Zellen unter PKI-Behandlung	66
Abb. 18: Filopodienbildung von HeLa-Zellen nach 16 h Migration unter Zugabe von FSK bzw. DMSO	68
Abb. 19: Protein-Protein-Interaktion von Cx43 mit PKA	70
Abb. 20: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit Cx43.....	71
Abb. 21: Protein-Protein-Interaktion von IRSp53 mit Cx43	73
Abb. 22: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit PKA	74
Abb. 23: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit IRSp53	74

Abb. 24: Phosphorylierung von VASP (S157) in stabil transfizierten HeLa-Zellen	76
Abb. 25: VASP-Phosphorylierung (S157) nach Behandlung mit PKI	77

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborausstattung	22
Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	23
Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien.....	25
Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen in der Zellkultur	26
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primärantikörper	27
Tabelle 6: Liste der verwendeten Sekundärantikörper	28
Tabelle 7: Liste der verwendeten Plasmide.....	29
Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer	30
Tabelle 9: Liste der verwendeten Kits	30
Tabelle 10: Liste der verwendeten und neu erstellten Zelllinien	32
Tabelle 11: Liste der erstellten Zelllinien	34
Tabelle 12: PCR-Ansätze für die ortsgerichtete Mutagenese.....	40
Tabelle 13: PCR-Protokoll 1	40
Tabelle 14: PCR-Protokoll 2.....	41
Tabelle 15: Liste der Antikörper und jeweiligen Protein-Beads für IP	48

Abkürzungen

A	Alanin
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cAMP	cyklisches Adenosinmonophosphat
Cdc42	cell division cycle 42
Cx43	Connexin 43
DMEM	Dulbecco´s Modifiziertes Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eGFP	enhanced green fluorescence protein
F	Phenylalanin
G	Glycin
g	Gramm
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase
GJ	Gap Junction
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HeLa	Henrietta Lacks
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase)
IRSp53	Insulin-Rezeptor-Substrat 53
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB-Medium	Lysogeny Broth-Medium
mA	Milliampere

min	Minute
M	molar
MW	Mittelwert
n	Nano
NBCS	Neugeborenen Kälberserum (new born calf serum)
OD	optische Dichte
P	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PMSF	Phenylmethanolsulfonylfluorid
R	Arginin
Rac1	Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1
RhoA	Ras homologue gene family member A
RT	Raumtemperatur
S	Serin
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfat)
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (standard error of the mean)
SH2	Src-homology 2
SH3	Src-homology 3
siRNA	small interfering ribonucleic acid
TE-Puffer	Tris/EDTA-Puffer
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VASP	Vasodilatator-stimuliertes Phosphoprotein
WASP	Wiscott-Aldrich-Syndrom-Protein
WAVE	WASP-family Verprolin-homologous protein
Y	Tyrosin
µl	Mikro
°C	Grad Celsius

I Einleitung

Connexin 43 (Cx43) hat neben seiner Rolle bei der Zell-Zell-Kommunikation über Gap Junctions (GJs) auch Kanal-unabhängige Funktionen, u. a. bei der Regulation der Zellmigration. Die Expression von Cx43 ist bei Prozessen, die mit verstärkter Migration einhergehen, erhöht und umgekehrt führt die Herabregulierung von Cx43 zu verminderter Zellmigration (Bates et al., 2007; Huang et al., 1998; Lo et al., 1999). Die genauen Mechanismen, die bei der migrationssteigernden Wirkung von Cx43 beteiligt sind, sind allerdings noch ungeklärt. Das Verständnis der involvierten Prozesse könnte helfen Medikamente gegen pathologische Prozesse, bei denen eine fehlgesteuerte Migration eine Rolle spielt, zu entwickeln.

1 Zellmigration

Die Zellmigration ist essentiell für verschiedene physiologische Prozesse, wie z. B. Embryogenese, Wundheilung, Immunabwehr und Angiogenese. Pathophysiologische Prozesse, die mit verstärkter Zellmigration einhergehen sind beispielsweise Tumordinvasion, Metastasierung und Atherosklerose (Friedl and Gilmour, 2009; Kraemer, 2000; Lamalice et al., 2007; Luster et al., 2005).

1.1 Reorganisation des Aktinzytoskeletts

Der Zellmigration liegt ein mehrstufiger Prozess zu Grunde, bei dem die koordinierte Reorganisation des Aktinzytoskeletts eine wesentliche Rolle spielt (Le Clainche and Carlier, 2008). Zuerst muss die Zelle eine Polarität, meist als Antwort auf extrazelluläre Signale, ausbilden. Anschließend werden an der Zellfront durch Aktinpolymerisierung Membranausstülpungen gebildet, die Lamellipodien und Filopodien. Mittels dieser Membranausstülpungen adhärirt die Zellfront an der extrazellulären Matrix, während diese am hinteren Teil der Zelle gelöst werden. Der hintere Teil wird durch Aktin-Myosin-Kontraktion nachgezogen, wodurch die Fortbewegung des Zellkörpers ermöglicht wird (Le Clainche and Carlier, 2008). Spezielle Proteine der Familie der Rho-GTPasen, RhoA, Rac1 und Cdc42, spielen

eine wichtige Rolle bei der Regulation des Aktinskeletts (Ridley, 2015). RhoA ist bei der Bildung von Stressfasern und fokalen Adhäsionskontakten involviert. Stressfasern sind kontraktile Bündel aus Aktin und Myosin, die häufig mit fokalen Adhäsionen assoziiert sind (Hotulainen and Lappalainen, 2006). Rac1 fördert die Bildung von Lamellipodien und Cdc42 die von Filopodien (Nobes and Hall, 1995). Lamellipodien sind breite flache Membranausstülpungen, die aus verzweigten Aktinfilamenten bestehen (Pollard and Borisy, 2003).

Im Gegensatz zur verzweigten Aktinstruktur der Lamellipodien, sind Filopodien dünne, fingerförmige Ausstülpungen, die aus dichten parallel angeordneten F-Aktin-Bündeln (filamentöses Aktin) bestehen. Filopodien spielen eine Rolle bei der Anheftung an die extrazelluläre Matrix und bei der Wahrnehmung ihrer Umwelt, wodurch sie zur gerichteten Migration beitragen (Jacquemet et al., 2015). Prozesse, wie Wundheilung, Wanderung von Neuronen, Embryonalentwicklung und Erkennung und Aufnahme von Pathogenen sind von der Filopodienbildung abhängig (Lowery and Van Vactor, 2009; Moller et al., 2013; Sanders et al., 2013; Vasioukhin et al., 2000). Filopodien enthalten Rezeptoren für verschiedene Signalmoleküle und Bestandteile der extrazellulären Matrix, wodurch sie beispielsweise chemische Gradienten wahrnehmen und zur Signaltransduktion beitragen (Migration navigieren) (Gupton and Gertler, 2007; Mattila and Lappalainen, 2008). Auch Integrine und Cadherine sind mit Filopodien assoziiert und tragen zur Adhäsion und Migration (durch Zugspannung) bei (Gupton and Gertler, 2007; Mattila and Lappalainen, 2008). Die Länge der Filopodien variiert je nach Zellart von ca. 1 μm bis ca. 100 μm , wobei die Kürzesten Mikrospeikes genannt werden und längere Filopodien interzelluläre Brücken, sogenannte „tunneling nanotubes“ (TNTs) bilden können (Davis and Sowinski, 2008; Leijnse et al., 2015). Die durchschnittliche Filopodienlänge in Zellen von Säugetieren beträgt 8-15 μm (bei HeLa-Zellen 14 μm) und die Lebenszeit liegt zwischen 79 und 142 s (Lim et al., 2008b).

Zur Bildung von Filopodien existieren verschiedene Modelle, wie das „convergent elongation model“, bei dem Filopodien aus bereits existierenden Aktinfilamenten der Lamellipodien entstehen, indem diese vor dem Capping bewahrt und von Fascin quervernetzt werden (Gupton and Gertler, 2007). Das „de novo filament nucleation model“ beschreibt, dass Filopodien nicht von Lamellipodien abstammen, sondern neue Aktinfilamente an den Filopodienspitzen von Forminen

gebildet werden (Steffen et al., 2006). Ein weiteres Modell vereint beide Ansätze (s. Abb. 1). Hierbei entstehen Filopodien aus ungecappten Aktinfilamenten des von Arp2/3 netzwerkartig synthetisierten Lamellipodiums. Enabled/ Vasodilator-stimuliertes Phosphoprotein (Ena/VASP) und Dia2 sind hierbei an der Spitze der Filopodien lokalisiert, verhindern das Capping der Aktinfilamente und fördern deren Elongation. Dia2 kann zusätzlich neue unverzweigte Filamente synthetisieren. Myosin-X verbindet die Aktinfilamente, was zur Bildung eines Filopodiums und zur Ausstülpung der Plasmamembran führt. Insulin Rezeptor Substrat p53 (IRSp53) lagert sich an die gekrümmte Membran und erleichtert die weitere Ausstülpung durch direkte Membrandeformation. Gleichzeitig rekrutiert IRSp53 weitere Proteine, wie Ena/VASP, die auch zur Quervernetzung der Aktinfilamente an der Spitze beitragen, ebenso wie Fascin am gesamten Filopodium. Adhäsionsmoleküle, wie Integrine und Cadherine, werden mittels Myosin-X an die Filopodienspitze transportiert, wodurch die Anheftung an und die Interaktion mit der extrazellulären Matrix ermöglicht wird (Jacquemet et al., 2015; Mattila and Lappalainen, 2008).

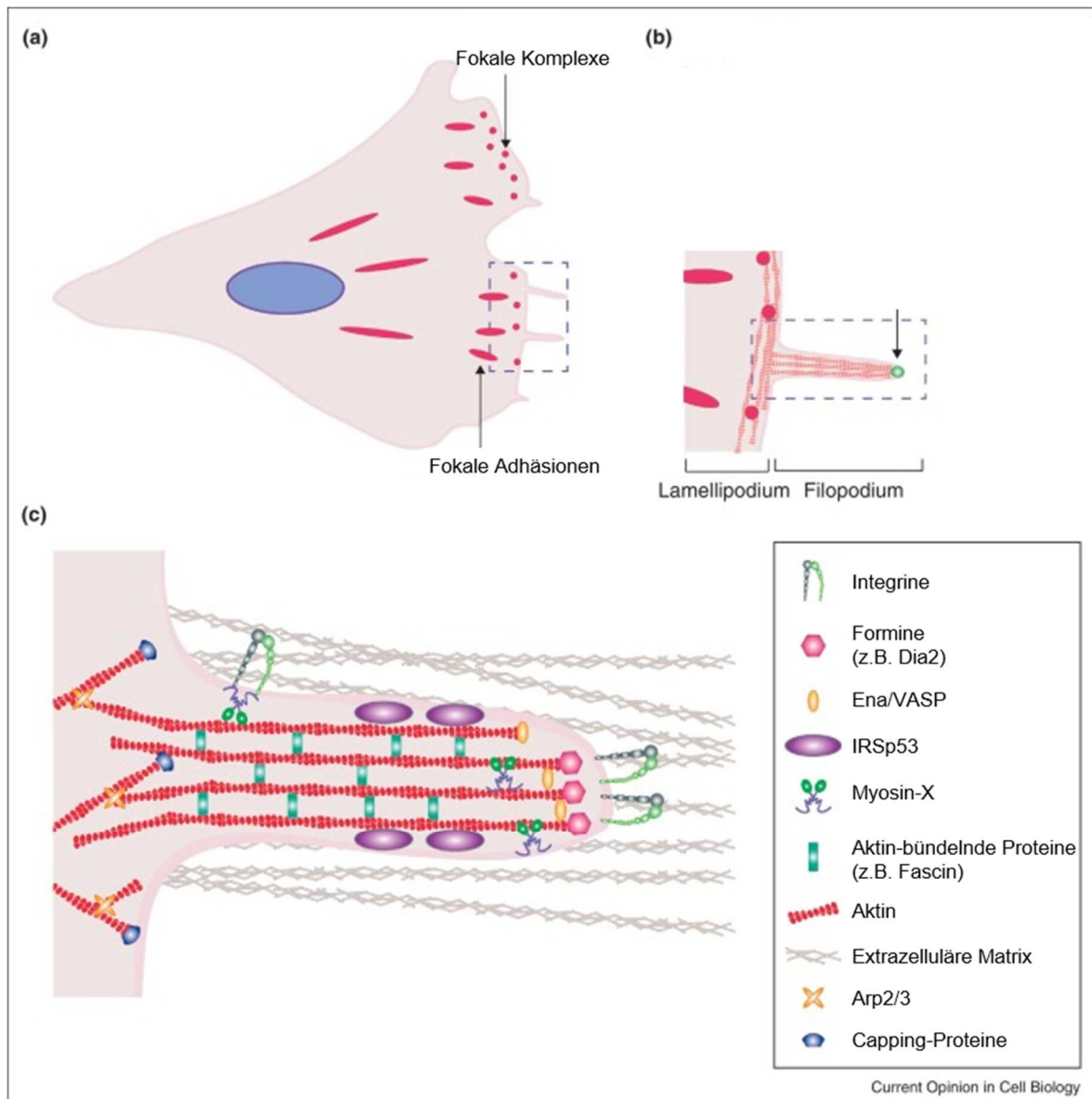


Abb. 1: Darstellung des Filopodienaufbaus während der Zellmigration. Modifiziert nach (Jacquemet et al., 2015)

2 Connexine und Gap Junctions

GJs stellen Transmembrankanäle zwischen unmittelbar benachbarten Zellen dar und ermöglichen den Austausch von kleinen Molekülen, wie Ionen, Metaboliten, sekundären Botenstoffen und bei linearer Konformation auch von siRNA oder Peptiden bis ca. 1,8 kDa (King and Lampe, 2005; Kumar and Gilula, 1996; Neijssen et al., 2005; Valiunas et al., 2005). Die interzelluläre Kommunikation über GJs ist u. a. von entscheidender Bedeutung bei der elektrischen Kopplung von Kardiomyozyten, die eine synchrone Kontraktion erlaubt (Severs, 1994), im

Immunsystem (Neijssen et al., 2007) und der koordinierten Vasodilatation in Arteriolen (de Wit et al., 2000).

GJs bestehen aus Connexinen. Je sechs Connexine bilden einen Halbkanal in der Zellmembran (Connexon) (s. Abb. 2). Diese Halbkanäle stellen eine hydrophile Pore mit 1,6 nm Durchmesser dar und ermöglichen einen geregelten Austausch von Molekülen zwischen dem Zytoplasma und dem Extrazellularraum. Hierüber können Connexine zur parakrinen bzw. autokrinen Signalübertragung beitragen (Perkins et al., 1997; Saez et al., 2010). Zwei Connexone von benachbarten Zellen können über ihre jeweiligen extrazellulären Schleifen, welche hochkonservierte Regionen der Connexine darstellen, aneinanderlagern und so einen GJ-Kanal bilden, der das Zytoplasma beider Zellen direkt verbindet (John and Revel, 1991; Rahman and Evans, 1991; White et al., 1995). Einzelne GJ-Kanäle lagern sich zu großen Clustern zusammen und bilden sogenannte GJ-Plaques (Segretain and Falk, 2004).

Im humanen Genom wurden bislang 21 Connexine identifiziert (King and Lampe, 2005; Söhl and Willecke, 2003, 2004). Die Connexine sind nach ihrem Molekulargewicht (von 25 bis 62 kDa) benannt (z. B. Cx43 hat 43 kDa) (Beyer, 1988; Evans and Martin, 2002; Söhl and Willecke, 2003, 2004). Connexine sind Transmembranproteine, bei denen sowohl der C- als auch der N-Terminus ins Zytoplasma ragt (s. Abb. 2). Der C-terminale Teil variiert in Länge und Aminosäure-Sequenz zwischen den verschiedenen Connexinen. Der Kanalteil ist hochkonserviert und besteht aus vier Transmembrandomänen, zwei extrazellulären und einer intrazellulären Schleife (Abb. 2) (Caspar et al., 1977; Makowski et al., 1977; Willecke et al., 2002). Die Termini und die intrazelluläre Schleife, vor allem aber der C-terminale Teil können auf vielfältige Weise posttranslational modifiziert werden, wodurch neben der Öffnung der Kanäle auch der Lebenszyklus der Connexine und intrazelluläre Signaltransduktion geregelt wird. Neben Phosphorylierung und Dephosphorylierung, sind Nitrosylierung, Acetylierung, Methylierung, SUMOylierung und Ubiquitinierung bekannt (Kjenseth et al., 2012; Leykauf et al., 2006; Locke et al., 2009; Straub et al., 2011). Zudem können Änderungen des Redox-Potentials zur Modifikation der Connexine führen (Pogoda et al., 2016). Die Permeabilität der GJ-Kanäle kann durch Änderungen des pH-Wertes, der Calcium-Konzentration oder Spannungs-abhängig reguliert

werden (Duffy et al., 2004; Peracchia, 2004; Spray et al., 1985; van Veen et al., 2001).

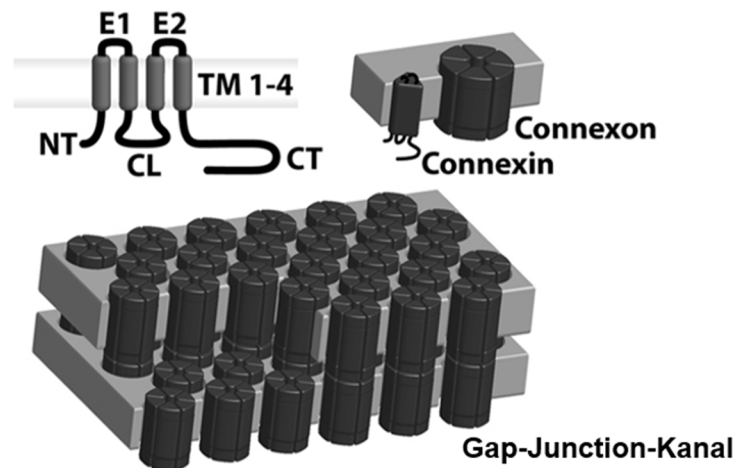


Abb. 2: Connexinstruktur und Aufbau von Gap Junctions. Connexine besitzen vier Transmembrandomänen (TM 1-4), wodurch zwei extrazelluläre Schleifen (E1, E2) und eine intrazelluläre Schleife (CL) gebildet werden. Der N-Terminus (NT) sowie der C-Terminus (CT) sind im Zytosol lokalisiert. Sechs Connexine bilden ein Connexon und werden in die Plasmamembran eingelagert. Connexone von benachbarten Zellen lagern sich zu Gap Junction Kanälen zusammen. Modifiziert nach: (Axelsen et al., 2013).

Neben ihrer Funktion als Kanalproteine, die die Bildung von GJs und damit die Übertragung von Molekülen, wie sekundärer Botenstoffe (cAMP, cGMP, Ca^{2+} , IP_3), sowie die metabolische und elektrische Kopplung der Zellen ermöglichen, wurden auch Kanal-unabhängige Funktionen der Connexine beschrieben. Connexine können die intrazelluläre Signaltransduktion über Interaktionen mit Proteinen oder Zytoskelettstrukturen beeinflussen (Giepmans, 2004). Beispielsweise kann Cx43 die Zellproliferation durch die Modulation der Expression von Genen, die den Zellzyklus regeln, beeinflussen (Chen et al., 1995; Sanchez-Alvarez et al., 2006). Auch für den Connexineinfluss auf die Zelldifferenzierung scheint der C-terminale, nicht Kanal-bildende Bereich ausreichend zu sein (Gu et al., 2003). Ein weiterer Kanal-unabhängiger Einfluss bestimmter Connexine wurde für die Regulation der Apoptose gezeigt. Cx43 kann durch die Interaktion mit Bax zur Apoptose beitragen (Sun et al., 2012).

3 Connexin 43

Connexin 43, auch Gap Junction alpha-1 Protein (GJA1) genannt, besteht aus 382 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 43 kDa (Laird and Revel, 1990). Es ist das am besten untersuchte Connexin, aufgrund seiner ubiquitären Expression in mindestens 35 Geweben und in 46 Zelltypen (Laird, 2006). Die essentielle Bedeutung von Cx43 zeigt sich auch darin, dass Knockout-Mäuse kurz nach der Geburt an Herzfehlbildungen sterben, die auf verringerte Migration von kardialen Neuralleistenzellen während der Embryogenese zurückzuführen sind (Huang et al., 1998; Lo et al., 1999; Reaume et al., 1995). Mutationen in Cx43 sind mit bestimmten Erkrankungen assoziiert, wie okulo-dento-digitale Dysplasie und hereditäre Palmoplantarkeratose (Paznekas et al., 2003; van Steensel et al., 2005). Änderungen der Expression von Cx43 können zu Herzrhythmusstörungen, Schlaganfall und verminderter Wundheilung führen (Fontes et al., 2012; Siushansian et al., 2001; Wang et al., 2007).

3.1 Der Lebenszyklus von Cx43

Cx43 wird im Endoplasmatischen Retikulum synthetisiert, aber oligomerisiert erst im trans-Golgi Netzwerk zum hexameren Connexon, was es von anderen integralen Membranproteinen unterscheidet (Musil and Goodenough, 1993). Die Connexone werden mittels sekretorischem Weg oder dem Mikrotubuli-abhängigen Vesikeltransport zur Plasmamembran transportiert (Lauf et al., 2002; Shaw et al., 2007). Die Connexone werden in die Plasmamembran eingelagert und wandern durch laterale Diffusion zur Peripherie der GJ-Plaques, wodurch die Plaques von außen nach innen wachsen (Gaietta et al., 2002). Die Halbwertszeit von Cx43 in der Membran beträgt 1,3 – 3,5 Stunden (Beardslee et al., 1998; Laird, 2005). Der Abbau der alten Connexone in der Mitte der Plaques erfolgt entweder als Connexosom, wobei komplette oder Fragmente von GJ-Plaques in eine der beiden Kontaktzellen internalisiert werden, oder von Halbkanälen durch Endozytose (Jordan et al., 2001; Laird, 2006; Leithe et al., 2006). Die internalisierten GJs werden dann lysosomal oder proteasomal abgebaut (Laird, 2006).

3.2 Posttranslationale Modifikationen von Cx43

Die C-terminale zytoplasmatische Region (AS 232 bis 382) ist von besonderer Bedeutung, da hier die Mehrzahl aller posttranslationalen Modifikationen und Protein-Protein-Interaktionen stattfinden. Sie ist bei Cx43 länger als bei den meisten Connexinen und enthält zahlreiche Stellen für verschiedene posttranslationale Modifikationen (Kjenseth et al., 2012; Leykauf et al., 2006; Pogoda et al., 2016). Bisher sind 21 Phosphorylierungsstellen im C-terminalen Bereich von Cx43 bekannt, wohingegen keine Phosphorylierungen in der N-terminalen Region oder den zytoplasmatischen Schleifen gefunden wurden (Axelsen et al., 2013).

Die bisher bekannten Phosphorylierungsstellen der C-terminalen Region von Cx43 sind in Abb. 3 dargestellt. Phosphorylierung spielt beim gesamten Lebenszyklus von Cx43 eine wichtige Rolle, angefangen von der Synthese, über zellulären Transport, GJ-Zusammenbau, Stabilität, Kanalöffnung, Permeabilität, GJ-Abbau, bis hin zur Regulation von Interaktionen mit anderen Proteinen (Axelsen et al., 2013; Solan and Lampe, 2014). Unterschiedliche Zustände der Gesamtphosphorylierung von Cx43 lassen sich bei der Western Blot Analyse an Hand einer Tripelbande detektieren. Cx43 wird als unphosphoryliertes Protein translatiert (entspricht der P0-Bande). Der Transport zur Plasmamembran wird durch Phosphorylierung an den Serinen 364 und 365 reguliert, die im Western Blot als P1-Bande sichtbar ist (Sosinsky et al., 2007). Der Einbau in GJ-Plaques wird durch Phosphorylierung an den Serinen 325, 328 und 330 durch die Casein Kinase 1 kontrolliert und entspricht der P2-Bande, die ausschließlich bei Bildung von GJs zu finden ist (Cooper and Lampe, 2002).

Cx43 kann durch Serin/Threonin-Kinasen oder Tyrosin-Kinasen phosphoryliert werden. Einige AS können von mehreren verschiedenen Kinasen phosphoryliert werden und häufig phosphoryliert eine Kinase auch mehrere AS (Abb. 3). Die Phosphorylierung von Cx43 durch die cAMP-abhängige Proteinkinase A (PKA) fördert die Bildung neuer GJs und führt zu einer verstärkten GJ-Kommunikation (Burghardt et al., 1995; Paulson et al., 2000; Shah et al., 2002). Potentielle Phosphorylierungsstellen von PKA sind die Serine 364, 365, 368, 369 und 373 (TenBroek et al., 2001; Yogo et al., 2002). Weitere Serin/Threonin-Kinasen, die durch C-terminale Phosphorylierung die Kanaleigenschaften von Cx43 verändern

können, sind AKT (PKB), die Casein Kinase 1 (CK1), die Ca^{2+} /Calmodulin Kinase II (CaMKII), die Cyclin-abhängige Kinase 5 (Cdk5), die Cyclin-abhängige Kinase p34cdc2 und die MAPK (Pogoda et al., 2016). Cx43-Funktionen, wie Kanaleigenschaften und intrazelluläre Signaltransduktion, können auch durch C-terminale Tyrosin-Phosphorylierungen über Src oder Tyrosinkinase 2 (Tyk2) kontrolliert werden. Sowohl Src als auch Tyk2 können die Tyrosine 247 und 265 in Cx43 phosphorylieren, was mit einer deutlichen Abnahme der GJ-Kommunikation verbunden ist (Giepmans et al., 2001a; Li et al., 2016). Zusätzlich ist ein indirekter Einfluss von Src und Tyk2 auf die GJ-Kommunikation bekannt, der durch die Kinasen MAPK, PI3K/Akt und PKC vermittelt wird (Geletu et al., 2012; Li et al., 2016). Im Allgemeinen verbessern die Kinasen CK1, PKA und AKT die GJ-Kommunikation, wohingegen PKC, MAPK, Tyk2 und Src diese reduzieren (Li et al., 2016; Thevenin et al., 2013).

Die Dephosphorylierung von Cx43 wurde bisher mit den Proteinphosphatasen PP1, PP2A und PP2B in Verbindung gebracht (Herve and Sarrouilhe, 2006).

Die Wirkung der verschiedenen Phosphorylierungen wurde hauptsächlich in Bezug auf die Kanalfunktion von Cx43 untersucht, während über deren Einfluss auf Proteininteraktionen und Signalwege nur wenig bekannt ist. Alle Kinasen, die Cx43 phosphorylieren, sind Teil von Signaltransduktionswegen und beeinflussen darüber verschiedene zelluläre Funktionen. Da Cx43 ein Zielprotein dieser Kinasen ist, können nicht nur dessen Kanalfunktionen reguliert werden, sondern die Interaktion der Kinasen mit Cx43 kann auch die Bindung von anderen Substraten/ Interaktionspartnern und/ oder die Enzymaktivität beeinflussen.

Die Internalisierung und der Proteinabbau von Cx43 werden ebenfalls über posttranslationale Modifizierung reguliert. Cx43 interagiert beispielsweise mit Mitgliedern der E3 Ubiquitin Ligase Familie, wodurch es ubiquitiniert wird (Leykauf et al., 2006). Zudem kann Cx43 SUMOyliert werden, was die Expression und damit die Zahl von GJ in der Membran erhöht (Kjenseth et al., 2012). Eine Nitrosylierung an Cystein 271 von Cx43 scheint eine Rolle bei der Regulation der Vasodilatation zu spielen und ist mit einer erhöhten GJ-Permeabilität verbunden (Straub et al., 2011).

den Verlust der Zellpolarität zur Folge hatte (Xu et al., 2006). Auch bei der embryonalen Gehirnentwicklung wird Cx43 verstärkt exprimiert und scheint eine essentielle Rolle zu spielen. So konnten Elias et al. zeigen, dass die Downregulation von Cx43 die embryonale Migration von Neuronen beeinträchtigt. Die Expression einer Cx43-Mutante ohne Kanalfunktion konnte die Migration der Neurone wiederherstellen, was auf eine Kanal-unabhängige Funktion schließen lässt (Elias et al., 2007). Die Expression von Cx43 mit einem mutierten Cystein in einer der extrazellulären Schleifen konnte dagegen die Migration nicht wiederherstellen (Elias et al., 2007; Lin et al., 2002). Die Interaktion der extrazellulären Schleifen von Cx43 bei Nervenzellen und Gliazellen scheint demzufolge wichtig für die radiale Migration von Neuronen entlang der Gliazellen zu sein. Dies zeigt, dass Cx43 durch die extrazellulären Domänen eine Adhäsion vermitteln kann, die möglicherweise zur gerichteten Migration beiträgt. Jedoch sind diese Adhäsionskräfte relativ schwach um extrazelluläre Ankerpunkte zu formen und könnten auch als Verankerung für intrinsische Migrationskomplexe dienen (Kameritsch et al., 2012). Neben diesen Studien, die eine migrationssteigernde Wirkung von Cx43 beschreiben, gibt es allerdings auch Studien, die einen inhibitorischen Effekt von Cx43 auf die Zellmigration beschreiben. Zum Beispiel führte die erhöhte Expression von Cx43 in Keratinozyten zu einer verzögerten Wundheilung bei Diabetes und die Herunterregulierung von Cx43 mit siRNA förderte die Migration bei Brustkrebszellen (Shao et al., 2005; Wang et al., 2007). Da beide Gewebearten mehrere Connexine exprimieren, könnten hier kompensatorische Effekte anderer Connexine oder Unterschiede zwischen den Geweben und Zelltypen diese scheinbar widersprüchlichen Ergebnisse erklären.

Bei der Migration können sich die Zellen als größere Gruppen oder als Einzelzellen fortbewegen. Bei der kollektiven Migration, bei der Zellen als zusammenhängende Gruppe wandern, geht eine erhöhte Expression von Cx43 auch mit einer stärkeren GJ-Kopplung einher (Friedl and Gilmour, 2009). Endothelzellen wandern oft koordiniert als Gruppe von gekoppelten Zellen. *In vitro* Versuche zeigten, dass bei migrierenden Endothelzellen an der Migrationsfront die Expression von Cx43 und GJ-Kopplung erhöht war (Pepper et al., 1992). Ebenso beim Wundassay mit kultivierten adrenokortikalen Zellen, die mit Cx43 transfiziert worden waren, oder bei der Gliomzell-Invasion im Gehirn konnte eine verstärkte

GJ-Kopplung über Cx43 nachgewiesen werden (Friedl and Gilmour, 2009; Oliveira et al., 2005).

Die Mehrheit der Studien deutet allerdings daraufhin, dass Cx43 die Migration und die damit einhergehenden Zytoskelettänderungen über einen Mechanismus, der unabhängig von der Kanalfunktion ist, beeinflusst. Ein Migrationsdefekt in neuronalen Vorläuferzellen konnte beispielsweise durch Expression einer Kanal-defizienten Cx43-Mutante kompensiert werden (Beahm et al., 2006). Ebenso führte in C6 Gliomzellen die Expression des Cx43-Volllängenproteins zu einer verstärkten Migration, während eine C-terminal verkürzte Variante keine migrationserhöhende Wirkung zeigte, was auf eine besondere Bedeutung für den C-terminalen Bereich schließen lässt (Bates et al., 2007). In einer Arbeit von Crespín et al. wurde gezeigt, dass die C-terminale Region von Cx43 ausreichend war, um in humanen LN18 Gliomzellen eine Aktinreorganisation hervorzurufen und dadurch die Migration zu verstärken (Crespín et al., 2010). Auch in unserem Labor wurde gezeigt, dass die migrationsfördernde Wirkung von Cx43 von seinem C-terminalen Bereich vermittelt wird und die N-terminale Kanal-bildende Region hierbei nicht involviert ist (Behrens et al., 2010). Die Expression von Cx43 bzw. nur des zytoplasmatischen C-terminalen Bereichs von Cx43 führte zur vermehrten Bildung von Filopodien und einer gesteigerten Migration. Hierzu ist interessant, dass neben dem Volllängenprotein auch verschiedene verkürzte Isoformen von Cx43 koexprimiert werden, von denen die Isoform mit einer molekularen Masse von 20 kDa (GJA1-20k) am häufigsten auftritt (Smyth and Shaw, 2013). Die Isoformen stellen den C-terminalen Teil von Cx43 dar und entstehen durch alternative Translation (Salat-Canela et al., 2014; Smyth and Shaw, 2013). GJA1-20k beginnt bei Aminosäure 213 und besitzt somit keine Kanal-bildende Funktion (Salat-Canela et al., 2014). Auch in HeLa-Zellen, die Cx43 überexprimieren, konnte GJA1-20k detektiert werden (Joshi-Mukherjee et al., 2007). Zudem wurde gezeigt, dass GJA1-20k mit Aktin und Tubulin interagieren und F-Aktin stabilisieren kann (Basheer et al., 2017).

Die Interaktion des C-terminalen Bereichs mit Proteinen, die zur Regulation der Aktindynamik und Zellmigration beitragen, und die damit verbundene Bildung von Signalkomplexen an Cx43, könnte so einen Kanal-unabhängigen Einfluss erklären. In unserem Labor konnte gezeigt werden, dass Cx43 die p21-aktivierte

Proteinkinase 1 (PAK1) bindet, wodurch PAK1 verstärkt phosphoryliert wird und es zu einer erhöhten Aktivierung der Downstream-Effektormoleküle p38-MAPK und Hsp27 kommt. Die Phosphorylierung von Hsp27, welches in seiner unphosphorylierten Form ein Aktin-Capping Protein ist, bewirkt eine verstärkte F-Aktinpolymerisierung und trägt dadurch zu einer vermehrten Bildung von Filopodien und gesteigerten Migration bei (Abb. 4) (Kameritsch et al., 2015).

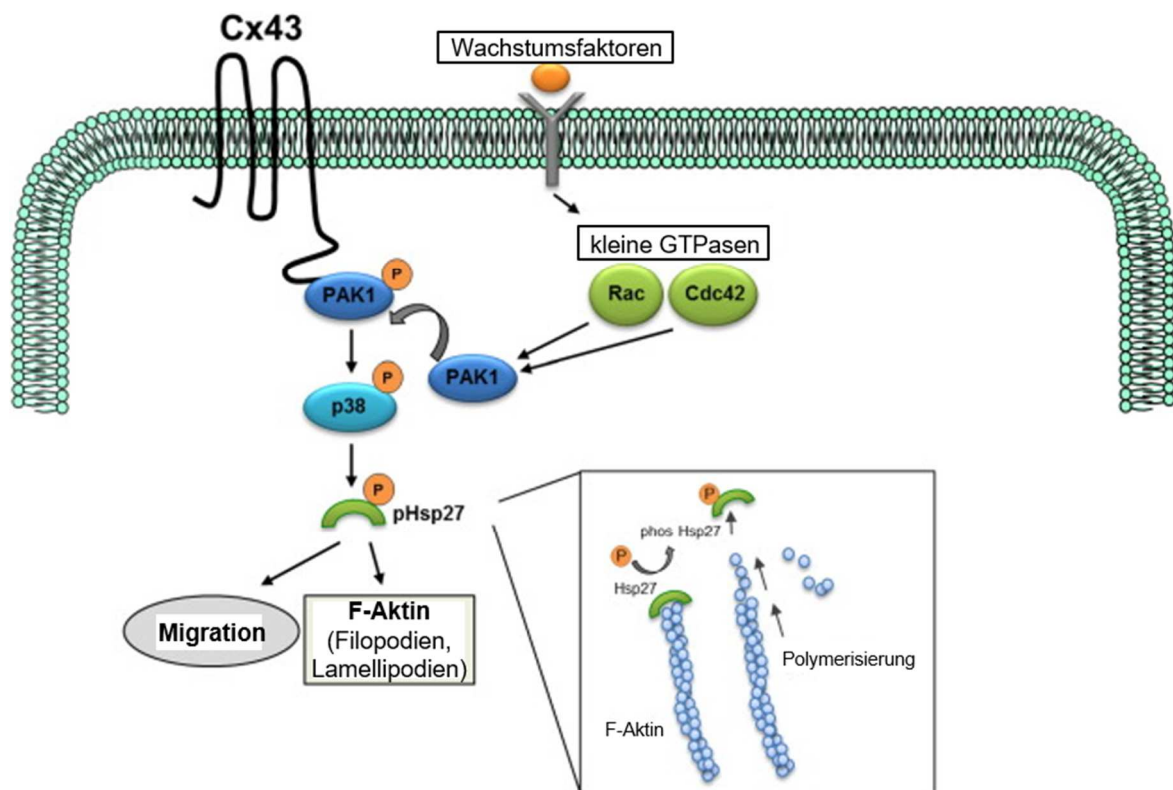


Abb. 4: Darstellung des Signalwegs, wie Cx43 zur vermehrten Filopodienbildung und Migration beiträgt. Die Stimulation mit Wachstumsfaktoren führt zur Aktivierung der kleinen GTPasen Rac1 und Cdc42, welche wiederum PAK1 aktivieren. Die Interaktion mit Cx43 veranlasst eine verstärkte Aktivierung von PAK1 und führt somit auch zu einer stärkeren Phosphorylierung von p38 und dessen Substrat Hsp27. Hsp27 erlaubt in seiner phosphorylierten Form die Aktinpolymerisierung und somit die Zellmigration. Modifiziert nach (Kameritsch et al., 2015)

3.4 Interaktionspartner von Cx43

Inzwischen sind über 40 Proteine bekannt, die mit Cx43 interagieren können (Giepmans, 2004; Laird, 2010; Sorgen et al., 2018) und in einer Studie konnten 236 putative Interaktionspartner von Cx43 in Rattenherzen identifiziert werden (Martins-Marques et al., 2015). Neben den Proteinen, die Cx43 posttranslational modifizieren können, interagiert Cx43 ebenso mit Zytoskelettproteinen, wie Aktin

und Mikrotubuli (Giepmans et al., 2001b; Wall et al., 2007), Adhäsionsproteinen, wie Cadherine, ZO-1, Occludin und Claudin (Fujimoto et al., 1997; Laird, 2006; Toyofuku et al., 1998), Transportregulatoren, wie Caveolin und 14-3-3 (Langlois et al., 2008; Park et al., 2007), und Wachstumsregulatoren, wie NOV und Cyclin E (Fu et al., 2004; Johnstone et al., 2012) (Abb. 5). Die mit Cx43 interagierenden Proteine regulieren den Lebenszyklus und die Kanaleigenschaften von Cx43, sind aber auch selbst Teil von Signaltransduktionswegen, wodurch die Interaktion mit Cx43 auch diese Signalwege, wie Zellwachstum und Migration, beeinflussen könnte. Beispielsweise kann Cx43 mit Aktin-bindenden Proteinen, wie Cortactin, Drebrin, α -Actinin, Vinculin und Ezrin interagieren und dadurch die Organisation des Zytoskeletts beeinflussen (Butkevich et al., 2004; Pidoux et al., 2014; Squecco et al., 2006; Xu et al., 2006). Fast alle Interaktionen werden vom C-terminalen Bereich von Cx43 vermittelt, wodurch Cx43 die Signalwege Kanal-unabhängig beeinflussen kann (Leithe et al., 2018).

einer Src homology 1 (SH1)-Domäne (Kinasefunktion), und einem C-terminalen regulatorischen Segment (Roskoski, 2015). Die SH2- und SH3-Domänen vermitteln die Interaktion mit Src-Effektorproteinen. Die SH2-Domäne ist etwa 100 AS lang und bindet an phosphorylierte Tyrosinreste in Zielproteinen, wobei die Bindung durch benachbarte AS-Reste (-2 bis +4 von phospho-Tyrosin) spezifiziert wird (Songyang et al., 1993). Die etwa 45 AS lange SH3-Domäne interagiert mit Prolin-reichen Motiven (etwa 10 AS lang) in Zielproteinen (Ren et al., 1993). Src kann mittels seiner SH2- und SH3-Domänen mit Cx43 interagieren (Lin et al., 2001). Dabei bindet Src mittels seiner SH3-Domäne an die Prolin-reiche Sequenz (Prolin 274 - Prolin 284) und phosphoryliert Tyrosin 265. Das phosphorylierte Tyrosin 265 ermöglicht die Bindung für die SH2-Domäne und anschließende Phosphorylierung von Tyrosin 247. Dadurch wird das Schließen der GJ-Kanäle und der Abbau von GJs ausgelöst (Atkinson and Sheridan, 1988; Lin et al., 2001). Eine neue Studie zeigte, dass Src Cx43 auch an Tyrosin 313 phosphorylieren kann und dadurch ebenfalls zum Abbau der GJs beiträgt (Zheng et al., 2019). Src reguliert aber auch verschiedene Prozesse, wie Zellproliferation, Differenzierung, Adhäsion und Migration (Thomas and Brugge, 1997). Hall et al. stellten fest, dass Src-defiziente Fibroblasten eine langsamere Migration aufwiesen, die auf die fehlende Kinase-Aktivität von Src zurückzuführen war (Hall et al., 1996).

Da Src mit Cx43 interagiert und bei der Zellmigration involviert ist, könnte die Src-Phosphorylierung von Cx43 auch Auswirkungen auf die Zellmigration haben. Ob die Src-Phosphorylierung von Cx43 oder ob die SH2- und SH3-Bindestelle in Cx43 durch Interaktionen mit weiteren anderen Proteinen einen Einfluss auf die von Cx43-vermittelte Migration haben, ist bisher nicht bekannt.

3.4.2 PKA

PKA spielt eine entscheidende Rolle bei diversen zellulären Signalwegen und kann mit einer Vielzahl von Effektorproteinen interagieren. Zu den Effektorproteinen zählen auch Zytoskelettbestandteile, wie Mikrotubuli, Intermediärfilamente und Aktinfilamente, wodurch PKA die Zellmigration beeinflussen kann (Howe, 2004; Shabb, 2001). Das PKA-Holoenzym ist ein Heterotetramer, bestehend aus zwei katalytischen (C) Untereinheiten und zwei regulatorischen (R) Untereinheiten. Die Aktivierung von PKA erfolgt über die

Stimulation von G-Protein gekoppelten Rezeptoren. Dies führt zur Aktivierung der Adenylylcyclase, welche die Synthese von cAMP aus ATP katalysiert. Die Bindung von cAMP-Molekülen führt zu einer Konformationsänderung und Dissoziation in ein R-Untereinheiten-Dimer und zwei monomere C-Untereinheiten. Die C-Untereinheiten phosphorylieren anschließend Serin- und Threonin-Reste in verschiedenen Effektorproteinen. Die Inaktivierung erfolgt über Phosphodiesterasen (PDE), welche cAMP in AMP umwandeln oder über direkte Phosphorylierung der C-Untereinheit (Tasken and Aandahl, 2004; Wong and Scott, 2004). Um eine lokal begrenzte Spezifität der Signaltransduktion mittels PKA zu gewährleisten, tragen A-kinase anchoring proteins (AKAPs) zur subzellulären Lokalisation von PKA bei und bringen PKA zu ihrem jeweiligen Bestimmungsort. AKAPs bestehen aus mehreren Untereinheiten und ermöglichen die Bildung eines Signalkomplexes von PKA und Effektorproteinen (Wong and Scott, 2004). Zu den AKAPs, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind, gehört zum Beispiel Ezrin (Tasken and Aandahl, 2004). Von Ezrin ist bekannt, dass es einen Komplex mit PKA und Cx43 bilden kann, wodurch Ezrin PKA zu Cx43 rekrutiert. Dieser Komplex reguliert die Öffnung der GJ-Kanäle durch Phosphorylierung von Cx43 in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration. Bei lokalem Anstieg von cAMP wird die an Ezrin gebundene PKA aktiviert und kann Cx43 an Serin 369 und 373 phosphorylieren, was zur Verbesserung der GJ-Kommunikation führt (Dukic et al., 2018; Pidoux and Tasken, 2015).

Die Aktivierung von PKA ist bedeutend für die Zellmigration, sowie für die Bildung von Lamellipodien und Filopodien. Auch hier scheint die lokal begrenzte Aktivierung von PKA eine Rolle zu spielen, da PKA sowohl positive als auch negative Effekte auf die Regulation des Zytoskeletts ausüben kann (Howe, 2004; Howe et al., 2005). In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass PKA am „leading edge“ von migrierenden Zellen verstärkt aktiviert ist, was zur gerichteten Migration beiträgt. Diese Aktivitätsgradienten unterstützen die Polarisierung von Zellen durch lokal unterschiedliches Signalling, bei dem PKA Regulatoren des Aktinzytoskeletts zielgenau beeinflussen kann (Lim et al., 2008a; Newell-Litwa and Horwitz, 2011; Paulucci-Holthauzen et al., 2009). Es wurde beispielsweise gezeigt, dass PKA G-Aktin direkt phosphorylieren kann, was dazu führt, dass dieses im Vergleich zu unphosphoryliertem G-Aktin schlechter zu F-Aktin polymerisieren kann (Ohta et al., 1987). Weitere PKA-Effektoren, die die Migration

beeinflussen, sind beispielsweise VASP, Src, SHP2, myosin light chain (MLC) und PAK1 (Howe, 2004). PAK1 ist bei der Reorganisation des Aktinzytoskeletts involviert und wird durch PKA-Phosphorylierung inhibiert (Howe and Juliano, 2000). Die Expression von konstitutiv aktiver PAK1 führte zur Bildung von Lamellipodien und Filopodien, sowie schnellem „turnover“ von Adhäsionen (Dummler et al., 2009). Zudem kann PKA über Rho-GTPasen die Migration beeinflussen. Die Rho-GTPasen RhoA, Rac1 und Cdc42 sind jeweils bei der Bildung von Stressfasern, Lamellipodien und Filopodien involviert und werden bei der Migration ebenfalls lokal begrenzt reguliert (Ridley et al., 2003). PKA kann die Aktivität der Rho-GTPasen durch direkte Phosphorylierung oder über die Modulation von Guanine triphosphate Exchange Factors (GEFs) und GTPase-activating Proteins (GAPs) kontrollieren (Bachmann et al., 2013; Feoktistov et al., 2000; Howe et al., 2005). RhoA wird von PKA inhibiert, wohingegen Rac1 und Cdc42 von PKA aktiviert werden (Ellerbroek et al., 2003; Feoktistov et al., 2000; O'Connor and Mercurio, 2001).

Da Cx43 von PKA phosphoryliert wird und PKA bei der Zellmigration involviert ist, könnte die PKA-Phosphorylierung auch Auswirkungen auf die von Cx43-vermittelte Migration haben. Zudem könnte die Bindung von PKA an Cx43 einen lokalen Aktivierungsmechanismus darstellen.

3.4.3 VASP

VASP ist ein PKA-Effektorprotein und ein Mitglied der Ena/VASP-Familie, zu der in Vertebraten auch mammalian Enabled (Mena) und Ena-VASP-like (EVL) gehören. Alle Mitglieder der Ena/VASP Familie bestehen aus drei konservierten Domänen: einer N-terminalen EVH1 Domäne (Ena/VASP homology 1) (für Rekrutierung zu fokalen Adhäsionen und Lamellipodien (Ball et al., 2000; Drees et al., 2000; Krause et al., 2004)), einer zentralen Prolin-reichen Domäne (PPR) (vermittelt Interaktionen mit Profilin und mit Proteinen, die SH3- oder WW-Domänen enthalten (Howe et al., 2002; Reinhard et al., 1995)) und einer C-terminalen EVH2 Domäne (Ena/VASP homology 2) (enthält G-Aktin- und F-Aktin-Bindestelle und ein Bindungsmotiv für die Tetramerisierung (Bachmann et al., 1999)) (Krause et al., 2003). Ena/VASP-Proteine regulieren die Migration, indem sie die Aktinpolymerisierung an der Plasmamembran durch verschiedene

Funktionen fördern (Krause et al., 2003). Sie verhindern das Capping von Aktinfilamenten und reduzieren die von Arp2/3 induzierte Verzweigung der Aktinfilamente. Dadurch kommt es zur Bildung von langen, unverzweigten parallelen Aktinfilamenten, was eine Voraussetzung für die Bildung von Filopodien ist (Barzik et al., 2005; Bear et al., 2002; Skoble et al., 2001). Die VASP-vermittelte Rekrutierung von Profilin trägt durch die Lieferung von G-Aktin zur Elongation der Aktinfilamente bei (Ferron et al., 2007). Da Ena/VASP-Proteine bei der Regulation der Migration und damit verbundenen Änderungen des Aktinzytoskeletts eine Rolle spielen, findet man sie vor allem an fokalen Adhäsionen, der Lamellipodienfront und der Spitze von Filopodien (Gertler et al., 1996; Reinhard et al., 1992; Rottner et al., 1999).

Die Funktion und Lokalisierung der Ena/VASP-Proteine wird durch Phosphorylierungen reguliert. Bekannte Phosphorylierungsstellen von VASP sind Y39, S157, S239, T278 und S322 (Döppler and Storz, 2013). PKA phosphoryliert die Serine 157, 239 und Threonin 278, wobei Serin 157 die Hauptphosphorylierungsstelle durch PKA ist (Butt et al., 1994; Smolenski et al., 1998). Die PKA vermittelte Phosphorylierung reduzierte die Interaktion von VASP mit G-Aktin und Aktinfilamenten, sowie seine Aktinpolymerisierungsfunktion (Harbeck et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002). Zudem wurde beobachtet, dass die PKA-Phosphorylierung die Anti-Capping-Aktivität von VASP inhibiert und die Aktinbündelung reduziert (Barzik et al., 2005). Lin et al. konnten zeigen, dass die VASP-Phosphorylierung eine negative Rolle bei der Filopodienbildung spielt und für die Ausbildung einer Zellpolarität bei einem cAMP-Gradient nötig ist (Lin et al., 2010).

In Kardiomyozyten wurde gezeigt, dass Cx43 Teil eines Komplexes mit Mena/VASP, α -Spektrin, Aktin und α -Actinin ist (Benz et al., 2013). Ebenso in Kardiomyozyten konnte eine Co-Lokalisierung von VASP und Mena mit Cx43 nachgewiesen werden (Gambaryan et al., 2001). Bisher ist nicht bekannt, ob VASP direkt mit Cx43 interagiert, ob und wie PKA hierbei eine Rolle spielt und ob dies einen Einfluss auf die Zellmigration hat.

3.4.4 IRSp53

Das IRSp53, auch bekannt als brain-specific angiogenesis inhibitor 1-associated protein (2BAIAP2), ist ein Adapter- und Gerüstprotein und verbindet Membranausstülpungen mit darunterliegender Aktinpolymerisierung (Lim et al., 2008b). Dadurch spielt IRSp53 eine wichtige Rolle bei der Bildung von Filopodien, wobei der genaue Mechanismus noch nicht vollständig geklärt ist (Scita et al., 2008). IRSp53 enthält eine inverse Bin/Amphiphysin/Rvs-Domäne (I-BAR), die durch elektrostatische Interaktionen eine Membrankrümmung induziert, was zu Plasmamembranausstülpungen führt (Saarikangas et al., 2009). Zudem interagiert IRSp53 mit den Rho-GTPasen Rac1 und Cdc42 (GTP-gebundene Form), die an der Bildung von Lamellipodien und Filopodien beteiligt sind (Govind et al., 2001; Miki and Takenawa, 2002; Millard et al., 2005). Durch Bindung von Cdc42 an die Cdc42- and Rac-interactive binding domain (CRIB) von IRSp53 wird dessen Autoinhibierung aufgehoben und die SH3-Domäne frei (Govind et al., 2001; Kast et al., 2014). Dadurch kann IRSp53 mit Proteinen der WASP/WAVE-Familie (N-WASP, WAVE), die die Verbindung zwischen Membran und Zytoskelett herstellen, sowie Mitgliedern der Ena/VASP-Familie (Mena, VASP), interagieren (Ahmed et al., 2010; Lim et al., 2008b; Vaggi et al., 2011). Zudem kann IRSp53 selbst an G-Aktin binden und damit Membran und Aktinskelettstrukturen verbinden (Scita et al., 2008). In der Abwesenheit eines Migrationsstimulus bremst IRSp53 die Aktinpolymerisierung, indem es an die Plasmamembran bindet und Capping-Proteine rekrutiert. IRSp53 wird durch die Bindung von GTP-Cdc42 aktiviert und rekrutiert VASP an die Membrankrümmung. Der Cdc42:IRSp53:VASP Komplex führt zur Elongation der Aktinfilamente, wodurch die initiale Membranausstülpung stabilisiert und verlängert wird (Disanza et al., 2013; Vaggi et al., 2011). Bei einem alternativen Weg wird IRSp53 mittels CRIB-Domäne von aktivem Cdc42 an die Membran rekrutiert und dessen Autoinhibierung gelöst, was zur Interaktion von IRSp53 mit Proteinen, die zur Aktinpolymerisierung beitragen, führt (Ahmed et al., 2010; Lim et al., 2008b).

Aufgrund der Lokalisierung von IRSp53 an der Zellfront, in Lamellipodien und der Spitze von Filopodien (Nakagawa et al., 2003), und der Interaktion mit VASP, wäre es denkbar, dass Cx43 und PKA ebenfalls in einem Komplex mit IRSp53 interagieren können.

4 Zielsetzung

In vorangegangenen Studien konnte in unserem Labor gezeigt werden, dass die Expression von Cx43 in HeLa-Zellen zu einer Migrationssteigerung führt. Durch die Expression von trunkierten Cx43-Proteinen konnte der migrationsfördernde Effekt auf den zytoplasmatischen C-terminalen Teil von Cx43 eingeschränkt werden. Der C-terminale Teil bzw. die GJA1-20k Isoform kann mit verschiedenen Proteinen interagieren und an zahlreichen Stellen posttranslational modifiziert werden. Wie sich diese Interaktionen und Modifikationen auf die Zellmigration auswirken, ist bisher noch wenig erforscht. Da erhöhte Migration bei Prozessen wie Wundheilung, Metastasierung und Atherosklerose eine wichtige Rolle spielt, könnte die Aufklärung des Mechanismus, wie Cx43 die Migration beeinflusst, zur Entwicklung neuer Medikamente beitragen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob die migrationssteigernde Wirkung von Cx43 durch potentielle Interaktionspartner beeinflusst wird. Es sollte analysiert werden, ob die SH2-, SH3-Bindestelle oder die PKA-Phosphorylierungsstellen in Cx43 eine Rolle bei der Migration und Filopodienbildung spielen. Zudem sollte untersucht werden, welche Zielproteine von PKA bzw. Src an der migrationssteigernden Wirkung von Cx43 beteiligt sind. Potentielle Mechanismen/ Signalwege, durch welche Cx43 die Migration beeinflussen kann, sollten ebenfalls untersucht werden.

Dazu wurden Cx43-Mutanten generiert, bei denen potentielle Bindungs- bzw. Phosphorylierungsstellen substituiert wurden (SH2- und SH3-Bindedomäne sowie PKA-Phosphorylierungsstellen). Anschließend sollte die Auswirkung dieser Mutationen auf die Zellmigration und das Zytoskelett analysiert werden.

II Material und Methoden

1 Material

1.1 Laborausstattung

Tabelle 1: Liste der verwendeten Laborausstattung

Gerät	Hersteller
Agarosegelelektrophorese Kammer	Peqlab, Wilmington, USA
Bakterienbrutschrank WTC	Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland
Fluoreszenz-Plattenlesegerät infinite 200	Tecan Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Gel iX20 Imager	Intas Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen, Deutschland
Heiz- und Gassystem für <i>live cell imaging</i>	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Mikroskope: Konfokales Mikroskop: Leica TCS SP5 Migrationsmikroskop: Axio Observer Z1 Zellkultur: Leitz Fluovert FU	Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland Carl Zeiss GmbH, Jena, Deutschland Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland
NanoDrop Lite Spektrophometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
pH-Meter (S20-SevenEasy)	Mettler Toledo, Giessen, Deutschland
Powersupply Standard Power Pack P25	Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland
SDS-PAGE Laufkammer	Amersham Biosciences, San Francisco, USA
Semi-Dry Blotter	Eigenanfertigung, Franz Singer

Sterilbank LaminAir HB2448	Heraeus, Hanau, Deutschland
Thermocycler PCR V2.600	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Überkopfschüttler	Eigenanfertigung (LMU Werkstatt)
Vortex-Genie	Scientific Industries Inc, Springfield, USA
Wasserbad HAAKE SWB25	Thermo Haake GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Western Blot Detektor Orca Camera Controller	Hamamatsu Photonics, Hamamatsu, Japan
Z2 Coulter Particle Count and Size Analyzer	Beckman Coulter, Brea, Kalifornien, USA
Zellinkubator SANYO CO ₂ Incubator	SANYO Electric Co. Ltd., Moriguchi, Japan
Zentrifugen Biofuge primoR Micro 120 Rotina 35R	Heraeus, Hanau, Deutschland Hettich, Tuttlingen, Deutschland Hettich, Tuttlingen, Deutschland

1.2 Plastikware/ Verbrauchsmaterial

Tabelle 2: Liste der verwendeten Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
6-Well Platte (Flachboden, steril)	Corning Incorporated, Corning, USA
24-Well Platte (Flachboden, steril)	Corning Incorporated, Corning, USA
96-Well Platte (Flachboden, steril)	Corning Incorporated, Corning, USA
Amersham Hybond P 0,2 PVDF	GE Healthcare Life Sciences, Freiburg, Deutschland
Costar Stripette 5 ml, steril	Corning Incorporated, Corning, USA

Costar Stripette 10 ml, steril	Corning Incorporated, Corning, USA
Costar Stripette 25 ml, steril	Corning Incorporated, Corning, USA
Culture-Insert 2-Well, zur Selbstinsertion	Ibidi, Martinsried, Deutschland
Deckgläschen, 13 mm Durchmesser	Helmut Saur Laborbedarf, Reutlingen, Deutschland
Konisches Röhrchen, 15 ml	Falcon, Corning Incorporated, Corning, USA
Konisches Röhrchen, 50 ml	Falcon, Corning Incorporated, Corning, USA
Objektträger 76 x 26 mm	Menzel-Gläser, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Pipettenspitzen D10 (0,1-10 µl) DIAMOND Tower-Pack	Gilson Incorporated, Middleton, USA
Pipettenspitzen D200 (2-200 µl) DIAMOND Tower-Pack	Gilson Incorporated, Middleton, USA
Pipettenspitzen D1000 (100-1000 µl) DIAMOND Tower-Pack	Gilson Incorporated, Middleton, USA
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Reaktionsgefäß 2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Westernblot-Gele: 8-16% Precise Tris Glycin Gels; 10 Well	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Whatman-Papier	
Zellkulturschale 100 x 20 mm	Falcon, Corning Incorporated, Corning, USA
Zellkulturschale 60 x 15 mm	Falcon, Corning Incorporated, Corning, USA
µ Columns	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
µMACS Micro Beads, Protein A	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch

	Gladbach, Deutschland
μMACS Micro Beads, Protein G	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
μMACS Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Deutschland
μ-Slide 8 Well, ibiTreat	Ibidi, Martinsried, Deutschland

1.3 Chemikalien

Tabelle 3: Liste der verwendeten Chemikalien

Substanz	Hersteller
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Agarose	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Albuminfraktion V	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aprotinin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Borsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
CaCl ₂	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
DMSO	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Ethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Formaldehyd 37%	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Forskolin	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Glycerin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Glycin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
HCl (37%)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

Hefeextrakt	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
KCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
Leupeptin	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
MgCl	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaCl	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
NaF	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₃ VO ₄	Alexis Corporation, Lausen, Schweiz
PKI 14-22 Amid (myristoyliert)	Tocris Bioscience, Bristol, Großbritannien
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH, Deutschland
SDS (ultrarein)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tris	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Triton X-100	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypton (Pepton von Casein)	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Tween 20	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
β-Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland

1.4 Zellkultur

Tabelle 4: Liste der verwendeten Substanzen in der Zellkultur

Substanz	Hersteller
DMEM (Dulebecco's modified eagle	gibco by life technologies, Thermo

medium) 1x Zellkulturmedium	Fisher Scientific, Waltham, USA
FBS (fetal bovine serum)	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Hank'sche Lösung ohne Phenolrot	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
Lipofectamine 2000	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
NBCS (newborn calf serum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PBS-Medium	Apotheke Klinikum der Universität München, Deutschland
Penicillin (10.000 units/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
Puromycin-Dihydrochlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Trypsin-EDTA	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Zeocin	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

1.5 Primärantikörper

Tabelle 5: Liste der verwendeten Primärantikörper

Antigen	Herkunft, Isotyp	Molekular-Gewicht [kDa]	Verdünnung Western Blot (Immunfluoreszenz)	Hersteller
Cx43	Kaninchen, polyklonal, IgG	43	1:500 (1:100)	Sigma-Aldrich, Merck, Darmstadt, Deutschland
c-Src	Kaninchen, polyklonal IgG	60	1:250	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Cruz

				Texas, USA
GAPDH	Maus, monoklonal, IgG1	38	1:20.000	Upstate/Millipore, Temecula, California, USA
GFP	Kaninchen, polyklonal, IgG	26	1:1000	Abcam, Milton, England
GM130	Maus, monoklonal, IgG1	130	(1:100)	BD Biosciences, Franklin Lakes, New Jersey, USA
IRSp53	Maus, monoklonal, IgG1	53	1:300	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, Texas, USA
phospho- VASP (S157)	Kaninchen, polyklonal, IgG	50	1:500	Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA
PKA C- α	Kaninchen, polyklonal, IgG	42	1:1000	Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA
VASP	Kaninchen, monoklonal IgG	46/ 50	1:500 (1:100)	Cell Signaling technology, Danvers, Massachusetts, USA

1.6 Sekundärantikörper

Tabelle 6: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Immunfluoreszenz		
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 488	1:200	Life Technologies, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Ziege anti-Kaninchen Alexa Fluor 546	1:200	
Ziege anti-Maus Alexa Fluor 488	1:200	

Ziege anti-Maus Alexa Fluor 546	1:200	
Western Blot		
Ziege anti-Kaninchen HRP	1:2000	Calbiochem, Merck
Ziege anti-Maus HRP	1:2000	Millipore, Darmstadt, Deutschland

1.7 Plasmide

Das Plasmid pcDNA4/myc-His Version B (Invitrogen) wurde für die Erstellung der Cx43-Mutanten verwendet. Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmid	Insert	Beschreibung	Referenz
pcDNA4-GFP	eGFP	eGFP	Juliane Behrens
pcDNA4-Cx43VL-GFP	rCx43-GFP	Cx43 (aus Ratte) C-terminal fusioniert mit GFP	Juliane Behrens
pcDNA4-rCx43 SH2-GFP	rCx43-SH2-GFP	Cx43 C-terminal fusioniert mit GFP; Mutation: Y247F, Y265F	diese Arbeit
pcDNA4-rCx43 SH3-GFP	rCx43-SH3-GFP	Cx43 C-terminal fusioniert mit GFP; Mutation: P274A, P277A, P280A, P283A	diese Arbeit
pcDNA4-rCx43 SH2-SH3-GFP	rCx43-SH2-SH3- GFP	Cx43 C-terminal fusioniert mit GFP; Mutation: Y247F, Y265F, Y267F, P274A, P277A, P280A, P283A	diese Arbeit
pcDNA4-rCx43 PKA-GFP	rCx43-PKA-GFP	Cx43 C-terminal fusioniert mit GFP; Mutation: S364A, S369G, S373G	diese Arbeit

1.8 Primer

Die unterstrichenen Basentriplets wurden substituiert und die jeweils fett gedruckte Base ausgetauscht.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Primer

Name	Sequenz (5' → 3')	Zielgen
Cx43_CT_For seq	GCT GGT GGT GTC CTT GGT GTC TCT CGC	Sequenzierung Cx43
PKA-3S_For	GAC CAA CGA CCT <u>GCC</u> AGC AGA GCC AGC <u>GGC</u> CGC GCC AGC <u>GGC</u> AGG	Austausch Serine in Cx43: S364A, S369G, S373G
PKA-3S_Rev	CG AGG CCT <u>GCC</u> GCT GGC GCG <u>GCC</u> GCT GGC TCT GCT <u>GGC</u> AGG TCG T	Austausch Serine in Cx43: S364A, S369G, S373G
SH2_Y247F_For	AGA AGC GAT CCT <u>TTC</u> CAC GCC ACC	Austausch Tyrosin in Cx43: Y247F
SH2_Y247F_Rev	GGT GGC GTG <u>GAA</u> AGG ATC GCT TCT	Austausch Tyrosin in Cx43: Y247F
SH2_Y265F_Y267F_For	GGA TCT CCA AAA <u>TTC</u> GCC <u>TTC</u> TTC AAT GGC	Austausch Tyrosine in Cx43: Y265F, Y267F
SH2_Y265F_Y267F_Rev	GCC ATT GAA <u>GAA</u> GGC <u>GAA</u> TTT TGG AGA TCC	Austausch Tyrosine in Cx43: Y265F, Y267F

1.9 Kits

Tabelle 9: Liste der verwendeten Kits

Kit	Hersteller
Enhanced Chemiluminescence (ECL)	AppliChem GmbH, Darmstadt,

detection system Kit	Deutschland
Pierce™ Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAGEN Plasmid Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits	Stratagene, Agilent, Santa Clara, Kalifornien, USA
Rapid DNA Ligation Kit	Roche, Basel, Schweiz

2 Methoden

2.1 Zellbiologische Methoden

2.1.1 Zelllinien

In dieser Arbeit wurden verschiedene HeLa-Zelllinien verwendet. Hierbei handelt es sich um Epithelzellen eines Zervixkarzinoms, die ursprünglich der Patientin Henrietta Lacks entnommen wurden. HeLa-Zellen wurden als Modellsystem verwendet, da sie in der Wildtyp-Form (WT) keine Connexine exprimieren und somit selektiv einzelne Connexine bzw. Connexin-Mutanten untersucht werden können. HeLa WT und HeLa-Zellen, die Cx43 exprimieren (HeLa Cx43) wurden uns von Dr. Klaus Willecke (Universität Bonn, Deutschland) zur Verfügung gestellt. HeLa Zellen, die mit dem Leervektor pBEHpac18 transfiziert wurden (HeLa LV), dienten als Kontrolle. Des Weiteren wurden stabil transfizierte HeLa-Zellen verwendet, die Cx43-GFP (Cx43 C-terminal mit eGFP fusioniert) exprimieren (Cx43 VL-GFP, generiert in unserer AG von Dr. Juliane Behrens) verwendet. HeLa Zellen, die Cx43 mit Mutationen in der SH2-, SH3-Bindestelle bzw. der PKA-

Phosphorylierungsstellen exprimieren, wurden während dieser Arbeit erstellt (s. Tabelle 10).

Tabelle 10: Liste der verwendeten und neu erstellten Zelllinien

Zelllinie	Transfiziertes Plasmid	Resistenz
HeLa WT	-	
HeLa LV	pBEHpac18	Puromycin
HeLa Cx43	pBEHpac18-rCx43 (Cx43 aus Ratte)	Puromycin
HeLa Cx43 VL-GFP	pcDNA4-rCx43VL-GFP (rCx43, AS 1-382)	Zeocin
HeLa Cx43 SH2-GFP	pcDNA4-rCx43 SH2-GFP	Zeocin
HeLa Cx43 SH3-GFP	pcDNA4-rCx43 SH3-GFP	Zeocin
HeLa Cx43 SH2-SH3-GFP	pcDNA4-rCx43 SH2-SH3-GFP	Zeocin
HeLa Cx43 PKA-GFP	pcDNA4-rCx43 PKA-GFP	Zeocin

2.1.2 Zellpassage

Die Zellen wurden in Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% "new born calf serum" (NBCS) und einem Antibiotika-Mix aus Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) bei 37% und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Zelllinie und Vektor-kodierter Resistenz wurde dem Medium Puromycin (1 µg/ml) oder Zeocin (200 µg/ml) hinzugegeben.

Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen passagiert. Hierzu wurde zuerst das alte Medium entfernt und die Zellen mit PBS⁻ (Phosphat gepufferte Salzlösung ohne Mg²⁺- und Ca²⁺-Ionen) gewaschen. Mittels Trypsinlösung (0,5% Trypsin, 0,2% EDTA) wurden die Zellen abgelöst und die Reaktion durch Zugabe von frischem Medium abgestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert und eine gewünschte Menge der Zellsuspension in eine neue Petrischale überführt und mit Medium verdünnt.

2.1.3 Einfrieren

Eine konfluente 100 mm Petrischale wurde mit PBS⁻ gewaschen und die Zellen mit Trypsinlösung abgelöst, in 1 ml Einfriermedium (90% FBS und 10% DMSO) resuspendiert und in Einfrierröhrchen zunächst bei -80 °C eingefroren, dann zur Langzeitlagerung in Tanks mit flüssigem Stickstoff (-196°C) aufbewahrt.

2.1.4 Auftauen

Die gefrorenen Zellen wurden im 37°C Wasserbad aufgetaut und in eine 100 mm Petrischale mit frischem Medium gegeben. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium am selben Tag gewechselt, um DMSO zu entfernen.

Alternativ wurden die gefrorenen Zellen im 37°C Wasserbad aufgetaut und mit frischem Medium gemischt. Nach Zentrifugation bei 1.200 UpM für 5 min wurde das Zellpellet in frischem Medium resuspendiert und in eine 100 mm Petrischale mit Medium gegeben. Nach Anwachsen wurde das Medium tags drauf gewechselt.

2.1.5 Transfektion

Um die Auswirkung verschiedener Cx43-Mutationen auf zelluläre Prozesse untersuchen zu können, ist die stabile Expression der mutierten Connexine eine Voraussetzung. Bei der stabilen Transfektion wird die transfizierte DNA entweder in die chromosomale DNA integriert oder als Episom in der Zelle behalten. Die Selektion einzelner Klone findet über Vektor-kodierte Resistenz gegen ein spezifisches Antibiotikum statt.

Für die stabile Transfektion der HeLa-Zellen mit Plasmid-DNA wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) gemäß den Angaben des Herstellers benutzt. HeLa WT Zellen wurden in 60 mm Kulturschalen so ausgesät, dass sie am nächsten Tag 50% konfluent waren. Für die Transfektion wurden 1,5 ml Opti-Mem und 15 µl Lipofectamine 2000 gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Um bestmögliche Transfektionseffizienzen zu erzielen, wurden verschiedene DNA-Konzentrationen (2,5 µg bis 7 µg Plasmid-DNA) zugegeben, kurz mit Hilfe eines Vortexers gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Die Zellen wurden mit PBS⁻ gewaschen und dann der Transfektionsmix vorsichtig

aufgebracht. Nach ca. 7 h Inkubation bei 37°C und 5% CO₂, wurden 2 ml Wachstumsmedium (DMEM; 10% NBCS) zugegeben. Am nächsten Tag wurde das Medium gewechselt und mit der Selektion (Zeocin) transfizierter Zellen begonnen. Alle zwei Tage wurde das Medium gewechselt und nach 14 Tagen wurden einzelne Klone mit Hilfe einer 200 µl Pipette in eine 24-Well Platte überführt. Die Transfektionseffizienz wurde über die Fluoreszenz der GFP-fusionierten Cx43-Proteine am Fluoreszenzmikroskop überprüft und die positiven Zellklone weiterkultiviert und vermehrt. Die Expression der mutierten Cx43-Proteine wurde mittels Western Blot bestätigt.

In dieser Arbeit wurden HeLa-Zellen mit folgenden Plasmiden transfiziert und stabil exprimierende Zelllinien generiert:

Tabelle 11: Liste der erstellten Zelllinien

Zellline	Transfiziertes Plasmid
HeLa Cx43 SH2-GFP	pcDNA4-rCx43 SH2-GFP (Cx43 Substitution: Y247F, Y265F)
HeLa Cx43 SH3-GFP	pcDNA4-rCx43 SH3-GFP (Cx43 Substitution: P274A, P277A, P280A, P283A)
HeLa Cx43 SH2-SH3-GFP	pcDNA4-rCx43 SH2-SH3-GFP (Cx43 Substitution: Y247F, Y265F, Y267F, P274A, P277A, P280A, P283A)
HeLa Cx43 PKA-GFP	pcDNA4-rCx43 PKA-GFP (Cx43 Substitution: S364A, S369G, S373G)

2.1.6 Migrationsanalyse

Die Migration der transfizierten HeLa-Zellen wurde mittels Wundassay untersucht. Dazu wurden spezielle Silikon-Inserts (Ibidi) verwendet (s. Abb. 6). Diese Silikon-Inserts besitzen jeweils zwei Kammern (Wachstumsfläche pro Kammer: 0,22 cm²) zum Ausbringen der Zellen. Die Inserts wurden mit einer sterilen Pinzette auf einen 8-Well Objektträger (µ-Slide 8-Well, Ibidi) gesetzt und die Fläche anschließend mit Collagen (1:400 in PBS⁺) beschichtet. Zum Befüllen der Kammern wurden die Zellen abgelöst, in Hungermedium (DMEM; 1% NBCS) resuspendiert (6 x 10⁵ Zellen/ml) und 70 µl pro Kammer ausgebracht. Nach

Anwachsen der Zellen über Nacht wurden die Inserts mit einer sterilen Pinzette entfernt, wodurch ein zellfreier Spalt von $500 \pm 50 \mu\text{m}$ entstand. Durch Zugabe von $300 \mu\text{l}$ Wachstumsmedium (DMEM; 10% NBCS) wurde die Migration in den zellfreien Spalt gestartet und mittels Zeitraffer-Mikroskopie (AxioObserver Z1, Zeiss) aufgezeichnet. Die 8-Well-Objektträger wurden in eine *live cell imaging*-Inkubationskammer (Ibidi) gesetzt und die Temperatur, Luftfeuchtigkeit und CO_2 -Konzentration mittels Heizungssystem und Gasmischer überwacht, um optimale Kulturbedingungen von 37°C und 5% CO_2 sicherzustellen. Bilder wurden alle 10 min für 24 h mit einer AxioCam Kamera (Zeiss) über die Software AxioVision (Zeiss) aufgenommen. Die Auswertung der Migration erfolgte mit der „manual tracking“ Software von ImageJ. Die Migrationsstrecken der Einzelzellen wurden mit dem free ImageJ plugin „Chemotaxis und Migration“ (Ibidi) auf folgende Parametern analysiert: Massenschwerpunkt (mittlerer Massenschwerpunkt aller Endpunkte), akkumulierte Distanz (Mittelwert der zurückgelegten Strecke der Einzelzellen), euklidische Distanz (gemittelte direkte Distanz von Anfangs- zu Endpunkt), Direktionalität (Quotient aus euklidischer Distanz und akkumulierter Distanz) und Geschwindigkeit (Quotient aus akkumulierter Distanz in μm und Zeit in s).

Um den Einfluss der PKA auf die Zellmigration zu untersuchen, wurde die Migrationsanalyse unter Zugabe von $10 \mu\text{M}$ Forskolin bzw. $30 \mu\text{M}$ PKI zur Aktivierung bzw. Inhibierung der PKA in Wachstumsmedium (DMEM; 10% NBCS) durchgeführt.

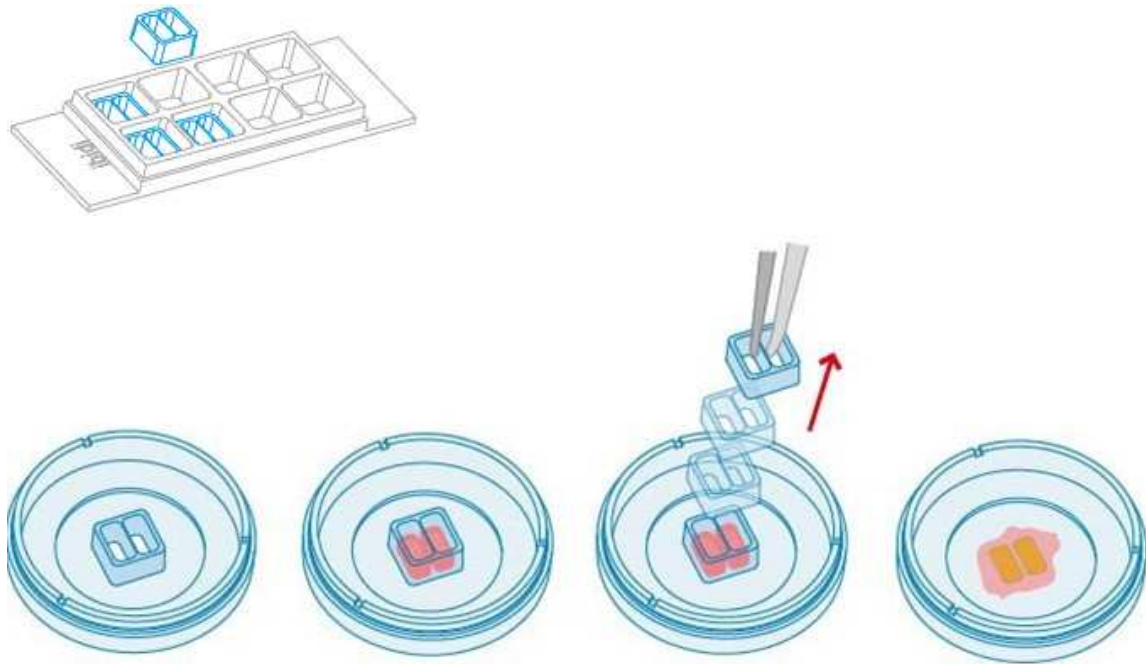


Abb. 6: Anwendung der Silikon-Inserts (Ibidi). Oben: μ -Slide-8-Well mit Silikon-Inserts für die Analyse der Zellmigration im Wundassay (<https://www.thistlescientific.co.uk/product/%C2%B5-slide-8-well/>). Unten: Schritt-für-Schritt-Anleitung zum Einsetzen, Befüllen und Entfernen der Inserts. Die Silikon-Inserts wurden mit einer sterilen Pinzette in das μ -Slide-Well eingesetzt. Die entsprechende Zellsuspension wurde in die Kammern der Inserts gefüllt und über Nacht bei 37°C, 5% CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Inserts vorsichtig mit einer sterilen Pinzette entfernt. Zurück bleibt ein Zellrasen mit einem zellfreien Spalt von ca. 500 μ m in der Mitte. Die μ -Slide-Well wurden mit Medium befüllt und der Versuch gestartet. Die Abbildung entstammt dem Ibidi-Handbuch (https://ibidi.com/img/cms/support/AN/AN21_Wound_Healing_Assay.pdf).

2.1.7 Golgi-Orientierung

Anhand der Golgi-Orientierung wurde die Direktionalität der Zellen nach der Migration gemessen. Um die Golgi-Orientierung zu bestimmen, wurde nach der Migration der Golgi-Apparat sowie der Zellkern gefärbt. Hierzu wurden die Zellen in Silikon-Inserts ausgesät, die auf 13 mm Glasplättchen gesetzt worden waren, und die Migration am nächsten Tag gestartet. Nach einer Migration von 16 h wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert, mit 0,2% BSA geblockt und über Nacht mit dem Antikörper gegen das Golgi-Matrixprotein GM-130 (1:100 in 0,2% BSA) bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen gewaschen und mit einem Fluoreszenz-markierten Sekundärantikörper (anti-Maus 1:200 in 0,2% BSA) zusammen mit dem DNA-Farbstoff TO-PRO-3 (Life Technologies; 1:1000 in 0,2% BSA) für 1 h bei RT gefärbt. Nach drei Waschschritten wurden die Deckgläschen auf einem Objektträger mit Einbettmedium platziert und nach dem Trocknen am

Konfokalen Mikroskop mit einem 40x Öl-Immersions-Objektiv analysiert. Die Zellen, bei denen sich der Golgi-Apparat in einem 120° Sektor zwischen Zellkern und Wunde (Migrationsspalt) befand, wurden als vorwärts orientiert eingestuft. Der prozentuale Anteil der Zellen in Vorwärtsorientierung in Bezug auf die Gesamtzahl der migrierenden Zellen wurde ermittelt. Nur Zellen an der Zellfront wurden ausgewertet.

2.1.8 Messung der Gap Junction-Kopplung über die interzelluläre Ca^{2+} -Ausbreitung

Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden mit dem Ca^{2+} -sensitiven Farbstoff Fura2 (Invitrogen) detektiert. Hierzu wurden HeLa-Zellen auf Deckgläschen (13 mm) ausgesät und am nächsten Tag mit dem Calcium-sensitiven Farbstoff Fura2 (4 μM in DMEM gelöst) für 30 min bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Nach Waschen der Zellen wurden diese in eine spezielle Kammer überführt und mit 200 μl HEPES (pH 7,4; 125 mM NaCl; 3 mM KCl; 1,25 mM NaH_2PO_4 ; 2,5 mM CaCl_2 ; 1,5 mM MgCl; 10 mM Glukose) überschichtet. Die Kammer wurde auf eine beheizte Platte (37°C), die an einem inversen Mikroskop fixiert wurde, eingesetzt. Durch mechanische Stimulation mit einer Glaspipette (Durchmesser der Spitze 1 μm) wurde in einer Zelle (Initialzelle) ein Anstieg der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration induziert und die Ausbreitung der Ca^{2+} -Signale über Gap Junctions in die Nachbarzellen gemessen. Durch Zugabe von Apyrase (50 U/ml; Sigma Aldrich) wurde verhindert, dass durch die Stimulation freigesetztes ATP zu einem parakrin vermittelten Ca^{2+} -Anstieg in benachbarten Zellen führte. Ca^{2+} -Signale wurden mit einem Computersystem (Till Photonics) gemessen, der die wechselnde Anregung (340 und 380 nm) kontrollierte und das Fluoreszenzsignal bei 505 nm detektierte. Änderungen der freien intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration wurden so, unabhängig von der Fura-Konzentration in der Zelle, durch Kalkulation der Ratio aus 340 nm/380 nm erfasst. Das Signal eines 640 nm x 480 nm großen Bereiches wurde alle 500 ms 3 min lang aufgezeichnet und der Hintergrund korrigiert. Die GJ-Kopplung wurde durch GJ-abhängigen Ca^{2+} -Transfer zwischen den Zellen (erste anliegende Zellreihe) über die Intensität der Ratio 340 nm/380 nm ermittelt. Die Zahl der Zellen mit erhöhter Ca^{2+} -Konzentration wurde auf die Gesamtzahl der Nachbarzellen normalisiert, wobei

100% Zellkopplung bedeutet, dass alle Nachbarzellen reagierten und Ca^{2+} -Signale über GJs ausgetauscht wurden.

2.1.9 F-Aktin-Färbung und Bestimmung der Filopodienanzahl

Um das Aktinzytoskelett fixierter HeLa-Zellen sichtbar zu machen, wurde Phalloidin, gekoppelt an Alexa Fluor 546 (Phalloidin-AF546), verwendet. Es handelt sich dabei um ein aus dem Pilz *Amanita phalloides* isoliertes Phallotoxin, welches F-Aktin bindet.

Die Zellen wurden auf Glasplättchen (13 mm) ausgesät, für 24 h auf Hungermedium (DMEM, 0% NBS) gesetzt und danach für 3 h mit 10% NBS-haltigem DMEM-Medium stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen, mit 3,7% Formalin in PBS⁺ für 15 min bei RT fixiert und danach wieder gewaschen (3x 5 min mit PBS⁺). Die Zellen wurden 5 min mit 0,1% TritonX-100 in PBS⁺ permeabilisiert und erneut mit PBS⁺ (3x 5 min) gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Phalloidin-AF546 (1:100 in PBS⁺) 1-2 h bei RT inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS⁺ wurden die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen Fluoromount-G (SouthernBiotech) auf einem Objektträger platziert.

Um die Filopodienbildung nach der Zellmigration an der Migrationsfront zu untersuchen, wurden Silikon-Inserts (Ibidi) auf 13 mm Glasplättchen aufgebracht und die Kammern mit 70 µl Zellsuspension (6×10^5 Zellen/ml) befüllt. Am Tag darauf wurde die Migration gestartet und nach 16 h beendet. Anschließend wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin-A546 gefärbt.

Am konfokalen Laser Scanning Mikroskop (TCS SP5; Leica) wurden Aufnahmen gemacht und diese ausgewertet. Die Filopodien einzelner Zellen wurden mit Hilfe der Leica LAS AF Lite-Software ab einer Länge von 2 µm gezählt.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde verwendet um spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* zu amplifizieren und somit eine ausreichende Menge für weitere Versuche zu erreichen. Die PCR besteht aus drei Schritten, die in Zyklen

wiederholt werden: Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation. Bei der Denaturierung werden die Stränge der Template-DNA getrennt, damit sich die Primer an die komplementäre DNA-Sequenz anlagern können (Primerhybridisierung). Bei der Elongation werden die fehlenden Stränge durch die DNA-Polymerase mit Nukleotiden vom 3'-Ende der angelagerten Primer aufgefüllt. Die Hybridisierungstemperatur der Primer wurde in Abhängigkeit von der Schmelztemperatur spezifisch für die verwendeten Primer eingestellt. Die Elongationszeit betrug für die *PfuTurbo* DNA-Polymerase (Agilent) 1 min/ Kilobase und wurde entsprechend der zu amplifizierenden DNA-Sequenz angepasst. Alle PCR-Reaktionen wurden im Thermocycler PCR V2.600 (Eppendorf) durchgeführt.

2.2.2 Ortsgerichtete Mutagenese von Plasmid-DNA

Die ortsgerichtete Mutagenese (Substitution von Aminosäuren) erfolgte mit Hilfe des QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kits (Stratagene, Agilent) und wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Diese Methode ermöglicht es, Punktmutationen, Insertionen oder Deletionen in doppelsträngigen DNA-Plasmiden zu erzeugen. Dazu werden zwei Primer synthetisiert, die die gewünschte Mutation in der Mitte der Oligonukleotidsequenz haben, flankiert von je 10 bis 15 Basen der korrekten DNA-Sequenz. Die Primer binden zum jeweils komplementären Strang des Plasmids. Für die PCR-Reaktion wurde die *PfuUltra* high-fidelity DNA-Polymerase (Agilent) eingesetzt.

Für die ortsgerichtete Mutagenese wurde der Vektor pcDNA4-rCx43VL-GFP (Cx43 AS 1-382, eGFP; von Juliane Behrens) als Template-DNA verwendet und die verschiedenen AS-Substitutionen (Cx43-SH2: Y247F, Y265F; Cx43-SH3: P274A, P277A, P280A, P283A; Cx43-SH2-SH3: Y247F, Y265F, Y267F, P274A, P277A, P280A, P283A; Cx43-PKA: S364A, S369G, S373G) mit den jeweiligen Primern (s. Tabelle 8) erzielt. Zuerst wurden zwei PCR-Ansätze mit je einem der beiden zusammengehörigen Primern amplifiziert und dann die Ansätze vereinigt und nochmals amplifiziert.

Tabelle 12: PCR-Ansätze für die ortsgerichtete Mutagenese

PCR-Ansatz 1		PCR-Ansatz 2	
Substanz	Menge [µl]	Substanz	Menge [µl]
Template Plasmid	1,0 (10-50 ng)	Template Plasmid	1,0 (10-50 ng)
Primer forward (100 pmol/µl)	0,4	Primer revers (100 pmol/µl)	0,4
dNTP Mix (25 mM)	0,4	dNTP Mix (25 mM)	0,4
10 x <i>Pfu</i> DNA- Polymerase Puffer	5,0	10 x <i>Pfu</i> DNA- Polymerase Puffer	5,0
<i>PfuTurbo</i> DNA- Polymerase	1,0	<i>PfuTurbo</i> DNA- Polymerase	1,0
Aqua ad infectabilia	42,2	Aqua ad infectabilia	42,2

Tabelle 13: PCR-Protokoll 1

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	1	10
Primerhybridisierung	55	1,5	10
Elongation	68	7	10

25 µl von jedem der PCR-Ansätze wurden gemischt und 0,75 µl *PfuTurbo* DNA-Polymerase zugegeben.

Tabelle 14: PCR-Protokoll 2

Schritt	Temperatur [°C]	Dauer [min]	Zyklen
Initiale Denaturierung	95	1	1
Denaturierung	95	1	18
Primerhybridisierung	55	1,5	18
Elongation	68	7	18

Zum Abbau des Ausgangsplasmids (parentale DNA) wurde das PCR-Produkt anschließend mit der Endonuklease DpnI behandelt, die spezifisch methylierte und hemimethylierte DNA spaltet. Da das eingesetzte Ausgangsplasmid durch Isolierung aus *E. coli* methyliert ist, wird nur dieses durch den DpnI-Verdau abgebaut. Der PCR-Ansatz wurde dazu für 2 min auf Eis gestellt und mit 2,5 µl DpnI (NEB) und 5,5 µl 10 x CutSmart Puffer (NEB) gemischt. Der Verdau fand über Nacht bei 37°C statt. Am nächsten Tag wurden 2,5 µl dieses Verdau in XL1-Blue Bakterien transformiert. Einzelkolonien wurden in LB-Medium für die Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen) angeimpft. Die korrekte Sequenz wurde durch Sequenzierung bestätigt und um Mutationen im Vektor auszuschließen in das Plasmid pcDNA4-GFP umklontiert. Um größere Mengen Plasmid-DNA für die Transfektion in HeLa-Zellen zu gewinnen, wurden Übernachtskulturen mit 250 ml LB-Medium angeimpft und Plasmidisolierungen mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) durchgeführt.

2.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarose-Gelelektrophorese wurden DNA-Fragmente gereinigt, identifiziert bzw. nach ihrer Größe aufgetrennt. Zur Herstellung der Agarosegele wurde 1% (w/v) Agarose in TBE-Puffer (2 mM EDTA, 89 mM Borsäure, 89 mM Tris HCl, pH 8,5) durch Erhitzen gelöst und das Gel mit 0,008% (v/v) GelRed (Biotium) angefärbt, welches in die DNA interkaliert. Dadurch können DNA-

Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Gelelektrophorese erfolgte in Flachbett-Elektrophoresekammern (BioRad, München), die mit TBE-Puffer als Elektrolyt gefüllt wurden. Die DNA-Proben wurden mit 6x DNA-Auftragspuffer (6x Loading Dye; Fermentas, Thermo Scientific) versetzt und in die Kammern des ausgehärteten Gels pipettiert. Zusätzlich wurde GeneRuler DNA Ladder 1kb (Fermentas, Thermo Scientific) als Längenstandard aufgetragen. Nachdem eine elektrische Spannung angelegt wurde, lief die negativ geladene DNA zur Anode und wurde durch die netzartige Struktur der Agarose aufgetrennt. Für die Gele wurde eine Spannung von 90 V für 45 min angelegt. Zur Detektion der DNA-Banden wurde das Gel im Anschluss mit UV-Licht bestrahlt und Bilder mit einem Geldokumentationssystem (Gel Doc 1000; BioRad) aufgenommen.

2.2.4 Reinigung der DNA-Fragmente

PCR-Produkte wurden mittels QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers gereinigt. Die DNA wird hierbei an eine Silica-Membran gebunden, wodurch Primer, Nukleotide und Salze gewaschen werden können.

Mit Restriktionsenzymen geschnittene DNA-Fragmente oder Plasmide wurden zunächst im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend ausgeschnitten. Die Elution der DNA aus den Gelstücken wurde mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) nach Herstellerangaben ausgeführt.

2.2.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Messung der Konzentration von isolierter Nukleinsäure erfolgte photometrisch bei 260 nm gegen das Elutionsmedium im Spektrophometer NanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific). In Quarzküvetten mit einer Schichtdicke von 1 cm entspricht der Extinktionswert 1,0 bei 260 nm ($OD_{260} = 1,0$) einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA (Sambrook, 2001). Verunreinigungen durch Polysaccharide konnten bei 230 nm und durch Proteine bei 280 nm bestimmt werden.

2.2.6 Enzymatische Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen erkennen und schneiden doppelsträngige DNA an spezifischen, meist palindromischen Erkennungsstellen, wodurch Fragmente definierter Größe entstehen. Zur Überprüfung der erstellten Plasmidkonstrukte wurde ein Restriktionsverdau durchgeführt. Für einen Doppelverdau mit BamHI und XhoI wurde folgender Ansatz hergestellt: 0,2 - 0,6 µg Plasmid-DNA, 2 µl 10x Puffer 3 (NEB), 0,2 µl BSA, 0,5 µl BamHI und 0,5 µl XhoI wurden vermischt und mit Aqua ad iniectabilia auf 20 µl aufgefüllt. Der Verdau erfolgte bei 37°C für 2 h. Anschließend wurden 10 µl auf ein 1%-Agarosegel aufgetragen, um die Größe des ausgeschnittenen Produkts (Insert) zu überprüfen.

Für Klonierungen bzw. Umklonierungen wurden 1 – 4 µg DNA verwendet.

Erkennungssequenz und Schnittstelle von:

BamHI: 5'- G[↓] GATCC -3'

3'- CCTAG[↑] G -5'

XhoI: 5'- C[↓] TCGAG -3'

3'- GAGCT[↑] C -5'

2.2.7 Ligation

Die Ligationen wurden mit dem Rapid DNA Ligation Kit (Roche) nach Angaben des Herstellers mit der T4-DNA-Ligase durchgeführt. Das Verhältnis von Vektor zu Insert betrug 1:3. Zur Umklonierung wurden 50 ng linearisierte und dephosphorylierte Vektor-DNA (pcDNA4-GFP) benutzt.

2.2.8 Transformation

Um die Plasmide in *E.coli* zu übertragen und somit zu amplifizieren, wurde das Hitzeschock-Verfahren angewandt. Hierzu wurden 40 µl superkompetente XL1-Blue Bakterien (Stratagene) auf Eis aufgetaut, mit 0,8 µl β-Mercaptoethanol vermischt und 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von gereinigter Plasmid-DNA (10 - 50 ng) bzw. 7 µl des Ligationsansatzes wurde der Ansatz 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock im Wasserbad bei 42°C für

45 s. Nachdem der Ansatz 2 min auf Eis gestellt wurde, wurden 450 µl vorgewärmtes LB-Medium (10 g/l Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 5 g/l NaCl) zugegeben und das Bakterien-DNA-Gemisch 1 h bei 37°C und 650 UpM im Thermomixer Comfort (Eppendorf, Wesseling-Berzdorf) inkubiert und anschließend auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C konnten am darauffolgenden Tag Einzelkolonien gepickt und LB-Übernachtskulturen angeimpft werden.

2.2.9 Plasmidisolierung

Zur Plasmidisolierung (von ca. 20-50 µg DNA) wurden 5 ml LB-Amp-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) mit Bakterieneinzelkolonien angeimpft, über Nacht bei 37°C geschüttelt und am darauffolgenden Tag für 10 min bei 5000 x g abzentrifugiert (Heraeus Multifuge 1L-R, Thermo Scientific). Die Extraktion der DNA aus dem Pellet erfolgte anschließend mittels QIAGEN Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers. Die Präparation der Plasmid-DNA basiert auf der alkalischen Lyse mit anschließender Reinigung, der an eine Säule gebundenen Plasmid-DNA.

Für die Isolierung größerer DNA-Mengen (200-500 µg DNA), wurde eine Plasmidisolierung mit dem QIAGEN Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde eine Übernachtskultur mit 250 ml LB-Amp-Medium angesetzt.

2.2.10 Sequenzierung

Die korrekten Sequenzen, der in dieser Arbeit verwendeten und hergestellten DNA-Plasmide, wurden durch Sequenzierung von Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland) bestätigt. Hierzu wurden 50-100 ng/µl Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl gelöst und zur Sequenzierung in Auftrag gegeben.

2.3 Proteinbiochemie

2.3.1 Herstellung von Proteinextrakten aus HeLa-Zellen

Für die Herstellung von Zelllysaten wurden HeLa-Zellen einer konfluente 100 mm Petrischale mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und in 1 ml eiskaltem Lysispuffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM TrisHCl, pH 8,0) lysiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach erneuter Inkubation von 15 min auf Eis wurde das Lysat bei 10.000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt.

2.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Gesamtproteinkonzentration in Lysaten von HeLa-Zellen wurde mit Hilfe des Pierce™ Bicinchoninic Acid (BCA) Protein Assay Kit (Thermo Scientific) kolorimetrisch bestimmt und entsprechend den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Methode beruht darauf, dass Peptidbindungen in Proteinen zweiwertige Kupferionen (Cu^{2+}) zu Cu^+ reduzieren, welches mit BCA zu einem violetten Komplex, mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm, chelatiert. Die Menge an reduziertem Cu^{2+} ist hierbei proportional zur Proteinkonzentration der untersuchten Lösung. Durch Messung einer Verdünnungsreihe eines Standardproteins, bovines Serumalbumin (BSA), mit bekannter Konzentration kann anhand einer Eichgerade die Proteinmenge der Probe bestimmt werden. Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mit 1:10 Verdünnungen der Zelllysate durchgeführt und mit dem Microplate Reader Infinite 200 (Tecan) gemessen.

2.3.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen erfolgte mittels SDS-PAGE nach Lämmli (1970). Bei dieser Methode werden Disulfidbrücken von nativen Proteinen durch Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert und nicht-kovalente Wechselwirkungen durch Erhitzen und die Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) zerstört. Durch Bindung an die SDS-Anionen wird die Ladung der Proteine negativ. Da die Menge an

gebundenem SDS proportional zum Molekulargewicht der Proteine ist, lassen sich die negativ geladenen Proteine nach ihrer Größe in einem elektrischen Feld auf einem Polyacrylamidgel in einem diskontinuierlichen Tris-Glycin gepuffertem System auftrennen. Es wurden Gradienten-Polyacrylamidgele (8-16% Precise Tris Glycin Gels; Thermo Scientific) verwendet.

Die Proben wurden vor dem Lauf mit 2x SDS- Probenpuffer (62,5 mM Tris, pH 8; 25% (v/v) Glycerin; 2% SDS; 0,01% Bromphenolblau; 0,5% β -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min bei 98°C denaturiert. Zur Bestimmung der Größe dienen Markerproteine mit bekanntem Molekulargewicht, die als Referenz eingesetzt werden. In dieser Arbeit wurde als Referenzmarker *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Scientific) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in Laufkammern für 8 x 9 cm Gele (Mighty Small II Units; Amersham Biosciences), gefüllt mit 1 x Tris-Glycin-SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris; 1,92 M Glycin; 35 mM SDS), bei 20 mA/Gel für ca. 1,5 h.

2.3.4 Western Blot (Semi Dry Blotting und Proteindetektion)

Die aufgetrennten Proteine wurden vom Polyacrylamidgel auf eine PVDF-Membran (Amersham Hybond-P; GE Healthcare) mittels Semi Dry Blotting unter Anwendung eines elektrischen Feldes übertragen. Hierzu wurde Filterpapier (Gel blotting paper GB003; Whatman) in Transferpuffer (48 mM Tris, 39 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0,0375% (w/v) SDS) äquilibriert und auf die Blot-Vorrichtung gelegt. Die PVDF-Membran wurde kurz in 100% Methanol aktiviert, sofort in Transferpuffer geschwenkt und auf das Filterpapier gelegt. Anschließend wurde das Gel luftblasenfrei auf die Membran überführt und ein äquilibriertes Filterpapier darübergelegt. Der Proteintransfer auf die Membran erfolgte elektrophoretisch bei 80 mA/Gel für 1 h.

Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran 10 min in PBST (8 g/l NaCl; 0,2 g/l KCl; 1,15 g/l Na_2HPO_4 ; 0,2 g/l KH_2PO_4 ; 0,1% (v/v) Tween 20) gewaschen und anschließend mit Magermilch (5 % (w/v) Milchpulver in PBST Puffer) für 1 h bei RT geblockt, um unspezifische Bindestellen abzusättigen. Die Membran wurde 10 min in PBST gewaschen und daraufhin mit primärem Antikörper, verdünnt in BSA-Lösung (5% BSA in PBST), über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 10 min wurde die Membran mit einem horseradish-

peroxidase (HRP)-konjugiertem sekundären Antikörper (in 5% Magermilch), für 1,5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran viermal je 10 min mit PBST gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Chemolumineszenz mit dem Enhanced Chemiluminescence (ECL) detection system (Applichem) nach Angaben des Herstellers. Dabei wird durch die Peroxidase die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid katalysiert, was als Emission von Licht detektiert werden kann. Die zwei Lösungen des Kits (Luminol Substrat und Peroxide Lösung) wurden im Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran damit inkubiert. Die Aufnahme der Chemolumineszenz erfolgte mit einer Digital-CCD-Kamera und der Wasabi Imaging Software (Hamamatsu Photonics).

2.3.5 Entfernen gebundener Antikörper von der Membran (Stripping)

Für den Nachweis weiterer Antigene wurden die Primär- und Sekundärantikörper mit Stripping-Puffer (Thermo Scientific) von der Membran entfernt. Dazu wurde die Membran für 15 min in Stripping-Puffer bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBST für je 10 min wurde die Membran erneut mit 5% Magermilch geblockt. Danach konnte die Membran mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert werden.

2.3.6 Immunpräzipitation

Mittels Immunpräzipitation (IP) können Proteine mit spezifischen Antikörpern, die diese Proteine binden, aus einem Proteingemisch (Zelllysate) präzipitiert werden. Da mit dem isolierten Protein auch daran gebundene Interaktionspartner präzipitiert werden, eignet sich diese Methode zur Identifizierung möglicher Protein-Protein-Wechselwirkungen. Die Proteinkomplexe können in einem Western Blot aufgetrennt und mit spezifischen Antikörpern analysiert werden.

Die IPs in dieser Arbeit wurden mit μ MACS Micro Beads (Miltenyi Biotec) durchgeführt. Für die Herstellung von Zelllysaten zum Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen wurden HeLa-Zellen einer konfluente 100 mm Petrischale mit eiskaltem PBS⁻ gewaschen und in 1 ml eiskaltem Lysispuffer (150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 50 mM TrisHCl, pH 8,0) lysiert. Nach 15 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein 2 ml Reaktionsgefäß

überführt. Nach erneuter Inkubation von 15 min auf Eis wurde das Lysat bei 10.000 x g, 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteinkonzentration bestimmt. 500 – 1000 µl des Lysates (750 µg) wurden für die IP verwendet. Hierzu wurden 1-2 µg Antikörper und 50 µl magnetische Protein-Beads (Protein A-Beads für Primärantikörper aus Kaninchen; Protein B-Beads für Primärantikörper aus Maus; µMACS Micro Beads, Miltenyi Biotec) zum Lysat gegeben und erst 30 min auf Eis und dann bei 4°C über Nacht auf einem Überkopfschüttler (Bildung eines Protein-Antikörper-Beads-Komplex) inkubiert. Für die IP wurden µ-Säulen in einen Magnetständer (µMACS Separation Unit und µ-Columns, Miltenyi Biotec) gestellt und mit 200 µl Lysispuffer gespült. Anschließend wurde das Lysat auf die Säule gegeben, wobei die Magnet-Beads mit den gebundenen Proteinen an die magnetische Säule hafteten. Nach viermaligem Waschen mit je 200 µl Lysispuffer und einmal mit 100 µl *low salt* - Waschpuffer (20 mM Tris HCl) wurden 20 µl 2 x SDS-Puffer (vorgewärmt auf 95°C) zugegeben, um die spezifisch gebundenen Proteine von der Säule zu lösen. Nach 5 min Inkubation wurden 50 µl vorgewärmter 2x SDS-Probenpuffer zur Säule gegeben und die Proben in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß eluiert. Das Eluat wurde 5 min bei 95°C denaturiert und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Folgende Antikörper und Protein-Beads wurden verwendet:

Tabelle 15: Liste der Antikörper und jeweiligen Protein-Beads für IP

Antikörper	Protein-Beads
IRSp53	B
PKA-C α	A
VASP	A

2.4 Immunfluoreszenzfärbung und konfokale Mikroskopie

2.4.1 Immunfluoreszenzfärbung

Um die Lokalisation oder Co-Lokalisation von Proteinen in der Zelle zu analysieren, wurden die jeweiligen Proteine mit Antikörpern detektiert und mit Hilfe von Fluorophor-markierten Sekundärantikörpern durch Fluoreszenzmikroskopie visualisiert.

Zur Immunfluoreszenzfärbung wurden HeLa-Zellen auf Glasplättchen (Durchmesser: 13 mm) ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurden die Zellen mit PBS⁺ gewaschen, mit 3,7% Formalin in PBS⁺ für 15 min bei RT fixiert und danach wieder gewaschen (3x 5 min mit PBS⁺). Anschließend wurden die Zellen 5 min mit 0,1% TritonX-100 in PBS⁺ permeabilisiert und erneut mit PBS⁺ (3x 5 min) gewaschen. Nach Blockieren mit 0,2% BSA in PBS⁺ für 1 h wurde die Probe mit Primärantikörper (verdünnt in 0,2% BSA in PBS⁺) bei 4°C über Nacht inkubiert. Nach vier Waschschritten mit PBS⁺ wurden die Zellen mit einem Sekundärantikörper, gekoppelt an Alexa Fluor 488 oder Alexa Fluor 546, (1:200 in 0,2% BSA in PBS⁺) für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Als Negativkontrolle wurden die Zellen nur mit Sekundärantikörper ohne vorherigen Primärantikörper inkubiert. Anschließend wurden die Zellen viermal mit PBS⁺ gewaschen und die Deckgläschen mit der Zellseite nach unten in einem Tropfen Fluoromount-G (SouthernBiotech) auf einem Objektträger platziert. Nach dem Trocknen wurden die Glasplättchen mit Nagellack versiegelt und bis zur Auswertung bei 4°C im Dunkeln gelagert.

2.4.2 Konfokale Mikroskopie

Zur Auswertung von mittels Immunfluoreszenz gefärbten Zellen wurde ein konfokales Laser Scanning Mikroskop (TCS SP5; Leica) verwendet. Dieses war mit einem Argon (488 nm) und zwei Helium-Neon (543 und 633 nm) Lasern ausgestattet. Da immer nur ein kleiner Punkt des Präparates beleuchtet wird und vor dem Detektor eine Lochblende angebracht ist, die nur Licht aus dem scharf abgebildeten Bereich durchlässt, kann die optische Auflösung stark erhöht werden. Das Präparat wird mit dem Laser an allen Punkten nacheinander abgescannt und zu einem Bild zusammengefügt. Es wurde das 63x Öl-Immersion-Objektiv mit verschiedenen Zoomfaktoren verwendet. Durch das Scannen verschiedener z-Ebenen, konnte ein dreidimensionales Bild rekonstruiert werden.

2.5 Statistik

Jedes Experiment wurde mindestens drei Mal wiederholt und die Ergebnisse als Mittelwert plus/minus Standardfehler angegeben. Die Software SigmaPlot 12.0

wurde zur statistischen Auswertung verwendet. Die verschiedenen Proben wurden mittels t-Test oder Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Post-hoc-Tests (Holm-Sidak-Methode) verglichen und bei $p \leq 0,05$ wurden die Unterschiede zwischen den Stichproben als signifikant angenommen. Daten, die nicht mit den parametrischen Tests analysiert werden konnten, wurden mit einer ANOVA on ranks getestet und die Daten entsprechend als Boxplots dargestellt. Die jeweiligen Angaben (Stichprobenanzahl n , verwendete Tests und p -Werte) zu den Experimenten sind in den Abbildungsbeschriftungen angegeben.

III Ergebnisse

1 Stabile Expression von mutierten Cx43 Proteinen in HeLa-Zellen und deren funktionelle Charakterisierung

1.1 Expression und zelluläre Lokalisation der Cx43-Mutanten

Um herauszufinden, welchen Einfluss die Phosphorylierung der C-terminalen Region von Cx43 durch Src oder PKA auf die Migrationssteigerung hat, wurden potentielle Src-Bindedomänen und PKA-Phosphorylierungsstellen mutiert. Die Interaktion von Src erfolgt über dessen SH3-Domäne, welche an die Prolin-reiche Region (P274-P284) in Cx43 bindet und an Tyrosin 265 phosphoryliert wird, wodurch die Bindung der SH2-Domäne hieran ermöglicht wird und Tyrosin 247 phosphoryliert werden kann (Lin et al., 2001).

Um die Bindung zu Src zu verändern, wurden in der SH3-Bindungsstelle von Cx43 die Proline 274, 277, 280 und 283 jeweils durch Alanin (Cx43-SH3: P274A; P277A; P280A; P283A) bzw. in der SH2-Bindungsstelle von Cx43 die Tyrosine 247 und 265 durch Phenylalanin (Cx43-SH2: Y247F; Y265F) ersetzt. Zusätzlich wurde eine Doppelmutante erzeugt, bei der sowohl die SH2-, als auch die SH3-Domäne mutiert wurde (Cx43-SH2-SH3: Y247F; Y265F; Y267F; P274A; P277A; P280A; P283A).

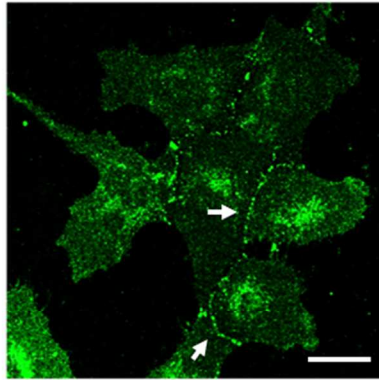
Hinsichtlich der PKA-Phosphorylierungsstellen im C-Terminus wurden die Serine 364, 369 und 373 mit Alanin bzw. Glycin substituiert (Cx43-PKA: S364A; S369G, S373G). Alle Cx43-Mutanten wurden C-terminal mit dem grün fluoreszierenden Protein (eGFP) gekoppelt, um ihre zelluläre Expression und Lokalisation mittels Fluoreszenzmikroskopie nachweisen zu können.

Weder die Mutationen der SH2- oder der SH3-Bindestelle, noch der PKA-Phosphorylierungsstellen verhinderten einen Einbau der Cx43-Proteine in die Membran, da die Zellgrenzen immer grün fluoreszierten (Abb. 7). Es zeigten sich aber gewisse Unterschiede in der intrazellulären Verteilung, die in dieser Arbeit jedoch nicht systematisch untersucht wurden. Die mit GFP gekoppelten Cx43-Mutanten waren in der gesamten Membran und besonders stark an Zell-Zellkontakten, sowie perinukleär lokalisiert (Abb. 7). Die Analyse der zellulären

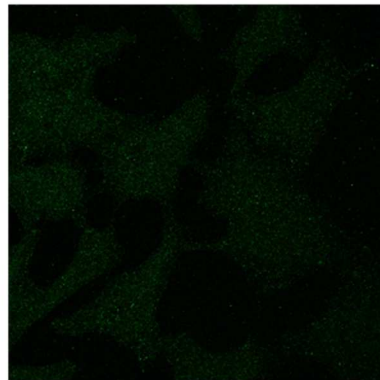
Expression und Lokalisation von Wildtyp-Cx43 ohne GFP in HeLa-Cx43-Zellen erfolgte mittels Immunfluoreszenzfärbung mit einem polyklonalen Antikörper gegen Cx43. Stabil transfizierte HeLa-Zellen, die Wildtyp-Cx43 exprimierten, zeigten die typische Punkt-förmige Verteilung von Cx43 in der Membran, besonders an Zell-Zell-Kontakten und perinukleär. Die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (LV-Zellen), die mit einem Cx43-Antikörper gefärbt wurden, zeigten dagegen keine Cx43-Expression und dienten als Kontrolle. Die Expression von Wildtyp Cx43-GFP diente ebenfalls als Kontrolle. Dieses war in der ganzen Membran lokalisiert (Abb. 7).

Antikörperfärbung

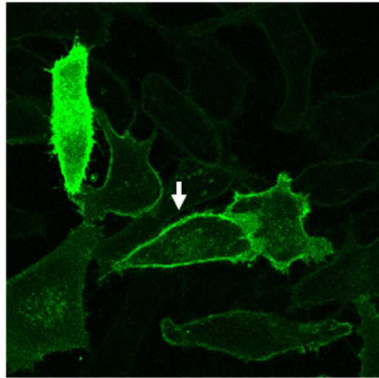
HeLa Cx43 anti-Cx43



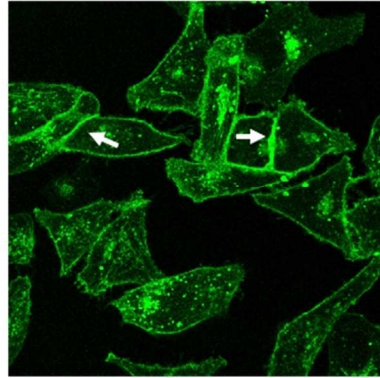
HeLa LV anti-Cx43



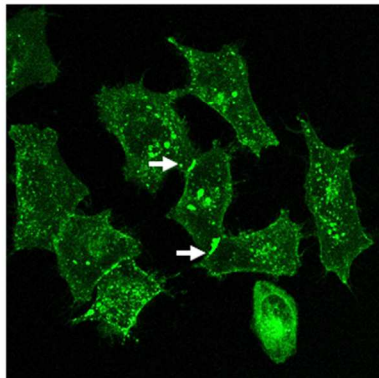
HeLa Cx43-GFP



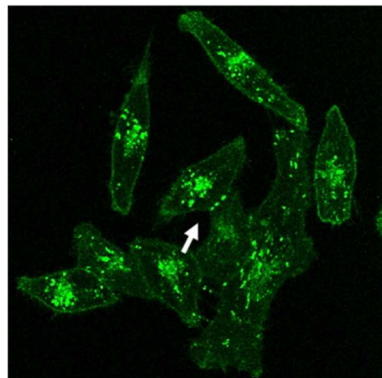
HeLa Cx43-SH2



HeLa Cx43-SH3



HeLa Cx43-SH2-SH3



GFP-Fluoreszenz

HeLa Cx43-PKA

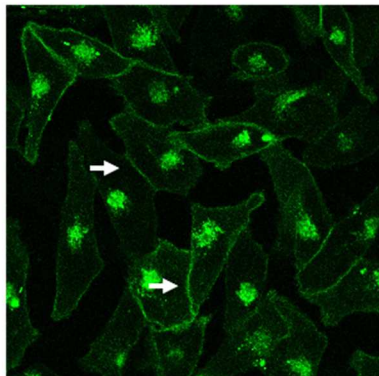


Abb. 7: Zelluläre Lokalisation der Cx43-Mutanten in HeLa-Zellen. Die GFP-gekoppelten Cx43-Mutanten wurden durch Anregung von GFP (488 nm) mit konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie auf ihre Lokalisation untersucht. Alle Cx43-Mutanten zeigten eine Lokalisation in der Membran, besonders an Zell-Zell-Kontakten (unten). Zum Vergleich der Cx43-Lokalisation dienten HeLa Cx43 Zellen, die mit einem Antikörper gegen Cx43 gefärbt wurden (oben). Cx43 zeigte hier die typische punktierte Verteilung in der Membran, besonders an Zell-Zell-Kontakten (Pfeile) und perinukleär. HeLa Cx43, die zur Kontrolle nur mit dem Sekundärantikörper gefärbt wurden, zeigten keine Färbung. Maßstabsbalken: 20 μ m.

Die Expression der mutierten Cx43-Proteine wurde zudem im Western Blot bestätigt. Als Kontrolle dienten HeLa-Zellen, die mit Cx43 Wildtyp-Protein (Cx43; 43 kDa) bzw. dem Leervektor (LV) transfiziert wurden. Die GFP-gekoppelten Cx43-Mutanten Cx43-SH2, Cx43-SH3, Cx43-SH2-SH3 und Cx43-PKA zeigten wie erwartet eine Bande bei ca. 70 kDa (43 kDa Cx43 + 27 kDa GFP), sowohl bei Detektion mit einem GFP- als auch mit einem Cx43-Antikörper (Abb. 8).

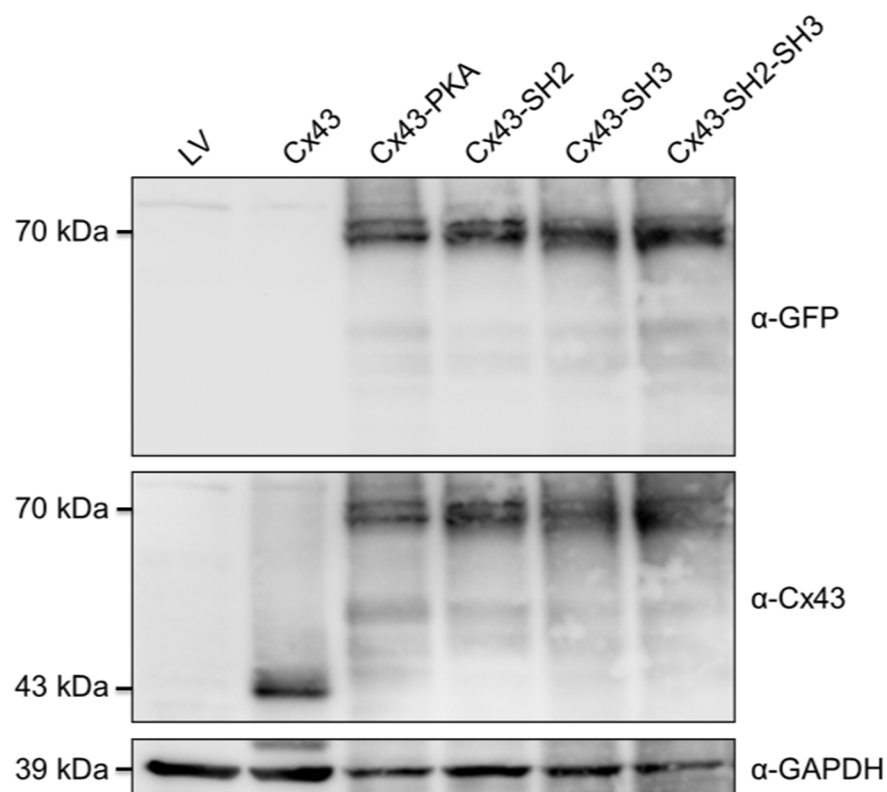


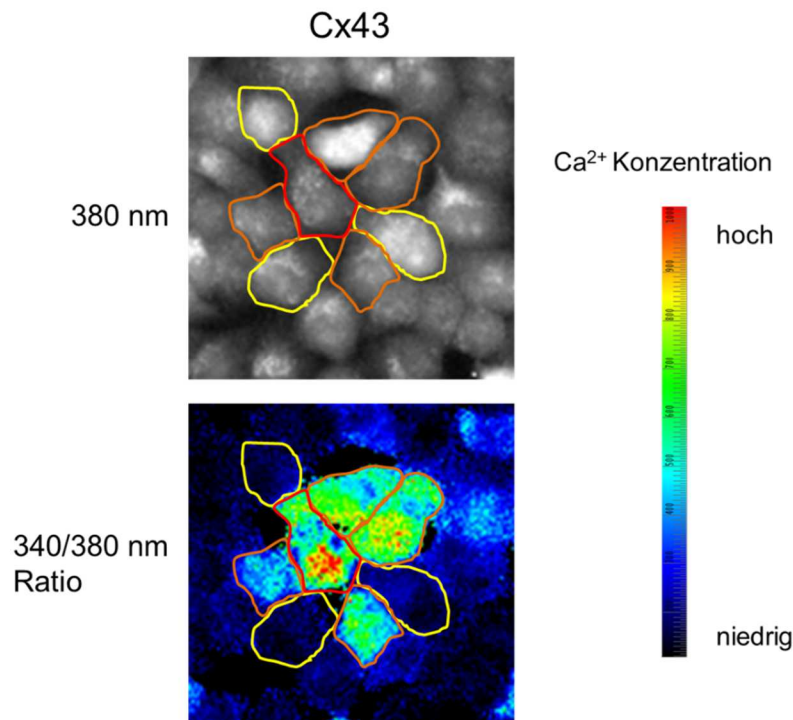
Abb. 8: Western Blot Analyse der Expression der Cx43-Mutanten in stabil transfizierten HeLa Zellen. Die Expression der mit GFP-gekoppelten Proteine Cx43-PKA, Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 konnte mit einem polyklonalen anti-GFP Antikörper bei der erwarteten Größe von ca. 70 kDa nachgewiesen werden. Nach anschließender Inkubation mit einem polyklonalen anti-Cx43-Antikörper wurde zusätzlich Cx43 bei einer Größe von 43 kDa detektiert. HeLa LV dienten als Negativkontrolle. Der Nachweis von GAPDH (39 kDa) wurde als Ladekontrolle zum Vergleich der aufgetragenen Proteinmengen verwendet.

1.2 Einfluss der Cx43-Mutationen auf die GJ-Kopplung

Um den Einfluss der Cx43-Mutationen auf die GJ-Kommunikation zu untersuchen, wurde die Ausbreitung von Ca^{2+} -Signalen nach mechanischer Stimulation einer initialen Zelle (rote Umrandung) in deren Nachbarzellen untersucht (Abb. 9A).

LV-Zellen wiesen im Vergleich zu Cx43-exprimierenden Zellen eine signifikant reduzierte Ca^{2+} -Ausbreitung in die Nachbarzellen auf (GJ-Kopplung in %, Median: Cx43: 53; LV: 0; Abb. 9B). Die GJ-Kopplung von Cx43-PKA Zellen unterschied sich nicht signifikant von Cx43-Zellen, erschien jedoch vergleichsweise am stärksten reduziert (GJ-Kopplung in %, Median: Cx43-PKA: 34; Abb. 9B). Die anderen Cx43-Mutanten zeigten eine ähnliche GJ-Kopplung wie Cx43-Zellen und unterschieden sich nicht signifikant (GJ-Kopplung in %, Median: Cx43-SH2: 67; Cx43-SH3: 68; Cx43-SH2-SH3: 45; Abb. 9B).

A



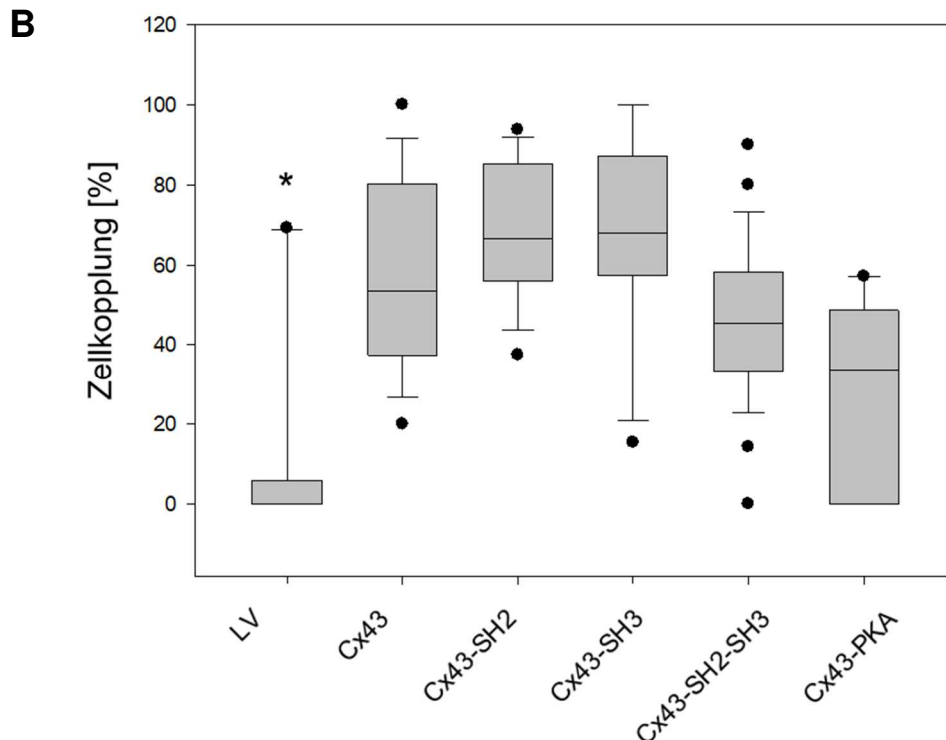


Abb. 9: Gap Junction-vermittelte Ca^{2+} -Ausbreitung in HeLa Cx43 und HeLa Cx43-Mutanten. (A) Repräsentative Fluoreszenzaufnahme von HeLa Cx43 Zellen (Fura2; Anregung 380 nm). Die rot umrandete Zelle wurde mechanisch stimuliert. Dadurch steigt die Ca^{2+} -Konzentration und breitet sich in die benachbarten Zellen aus (orange umrahmte Zellen), während die gelb umrahmten Zellen nicht reagierten. Das Verhältnis 340/ 380 nm entspricht dem Anstieg der Ca^{2+} -Konzentration. (B) **Quantitative Auswertung der benachbarten Zellen mit Anstieg des Ca^{2+} -Signals.** Die Mutation der SH2- und SH3-Bindungsstelle sowie der PKA-Phosphorylierungsstellen veränderte die Ausbreitung des Ca^{2+} -Signals im Vergleich zu Cx43 Zellen nicht, während LV-Zellen eine signifikant reduzierte GJ-Kopplung aufwiesen. Die Zellkopplung gemessen als reagierende Zellen in % ist dargestellt (n (LV) = 11 in 3 verschiedenen Kulturen, n (Cx43) = 17, n (Cx43-SH2) = 14, n (Cx43-SH3) = 18, n (Cx43-SH2-SH3) = 27, n (Cx43-PKA) = 12 in je 4 verschiedenen Kulturen ; (*) $p \leq 0,05$ vs. Cx43; Kruskal-Wallis einfaktorielle Varianzanalyse on ranks gefolgt von der Dunn's Methode).

1.4 Auswirkungen der Cx43-Mutationen auf die Zellmigration

Um zu untersuchen, ob die Cx43-Mutationen in den Src-Bindestellen und der PKA-Phosphorylierungsstellen die migrationssteigernde Wirkung von Cx43 beeinflussen, wurde die Migration im Wundassay analysiert.

Wie bereits frühere Studien der Arbeitsgruppe zeigten (Behrens et al., 2010), war die Migration von Cx43-exprimierenden HeLa-Zellen im Vergleich zu Cx-defizienten LV-Zellen signifikant erhöht. Die Expression von Cx43 mit Mutationen in der SH2- und/oder SH3-Bindungsstelle führte zu einer Abnahme der

Zellmigration im Vergleich zu Zellen, die Cx43-Wildtyp exprimierten, sodass diese vergleichbar mit der Migration von Cx-defizienten LV-Zellen war. Die Verschiebung des Massenschwerpunktes (Mittelwert der Migrationsendpunkte) war ebenso bei Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 gegenüber Cx43 signifikant reduziert. Dagegen führte die Expression von Cx43 mit mutierten PKA-Phosphorylierungsstellen zu einer weiteren Migrationssteigerung (akkumulierte Distanz, MW \pm SEM: LV: $158 \pm 17 \mu\text{m}$; Cx43: $327 \pm 27 \mu\text{m}$; Cx43-SH2: $132 \pm 27 \mu\text{m}$; Cx43-SH3: $160 \pm 14 \mu\text{m}$; Cx43-SH2-SH3: $162 \pm 6 \mu\text{m}$; Cx43-PKA: $483 \pm 44 \mu\text{m}$; Abb. 10A). Cx43-PKA-Zellen zeigten aber eher eine ungerichtete Migration, was sich anhand der erhöhten akkumulierten Distanz bei gleichzeitiger Verminderung der Verschiebung des Massenschwerpunktes widerspiegelte (Verschiebung Massenschwerpunkt, MW \pm SEM: LV: $111 \pm 13 \mu\text{m}$; Cx43 $195 \pm 13 \mu\text{m}$; Cx43-SH2 $43 \pm 1 \mu\text{m}$; Cx43-SH3 $68 \pm 7 \mu\text{m}$; Cx43-SH2-SH3: $53 \pm 5 \mu\text{m}$ und Cx43-PKA $51 \pm 4 \mu\text{m}$; Abb. 10B).

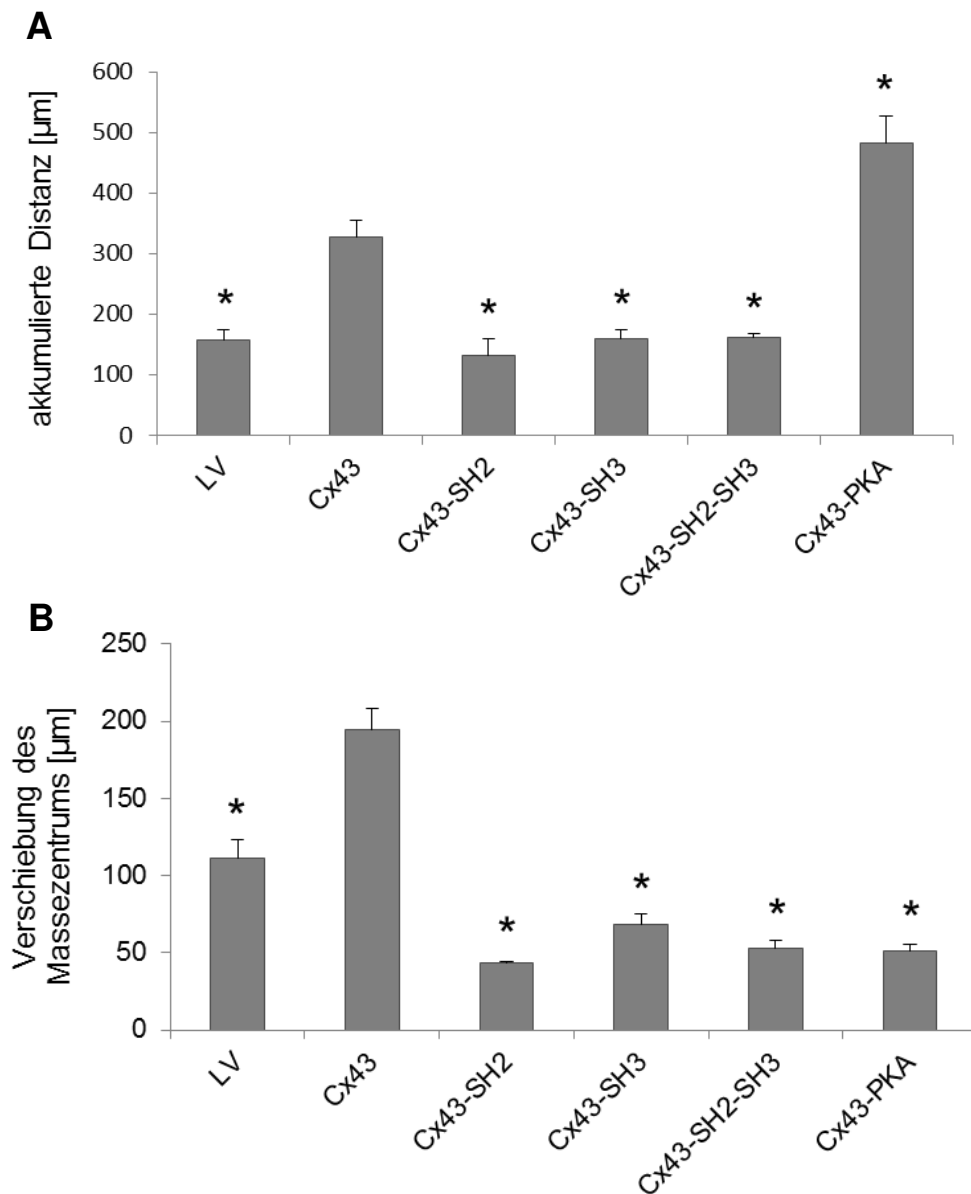


Abb. 10: Migration von HeLa Cx43 und HeLa Cx43-Mutanten im Wundassay. (A) Die Migration der transfizierten HeLa-Zellen wurde mit Serum stimuliert und nach 24 h analysiert. Die Expression von Cx43 führte zu einer Migrationssteigerung im Vergleich zu LV-transfizierten Cx-defizienten HeLa-Zellen. Im Vergleich zu HeLa Cx43 war die akkumulierte Distanz von HeLa Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 signifikant reduziert und von HeLa Cx43-PKA-Zellen gesteigert. **(B)** Dagegen war die **Verschiebung des Massenschwerpunkts** bei allen Cx43-Mutanten reduziert. der Verschiebung des Masseschwerpunkts im Vergleich zu Cx43 beobachtet werden. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt. (n = 4-7 unabhängige Experimente; (*) $p \leq 0,05$ vs. Cx43; einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

Da die Mutation der Src-Bindedomänen in Cx43 zur Reduktion der Migration führte, wurde der Einfluss von Src hierauf weiter untersucht. Die pharmakologische Inhibierung von Src mit Dasatinib (30 nM) führte zur signifikanten Reduktion der Migration von Cx43-exprimierenden Zellen, hatte jedoch keinen Effekt auf LV-Zellen (s. Abb. 11).

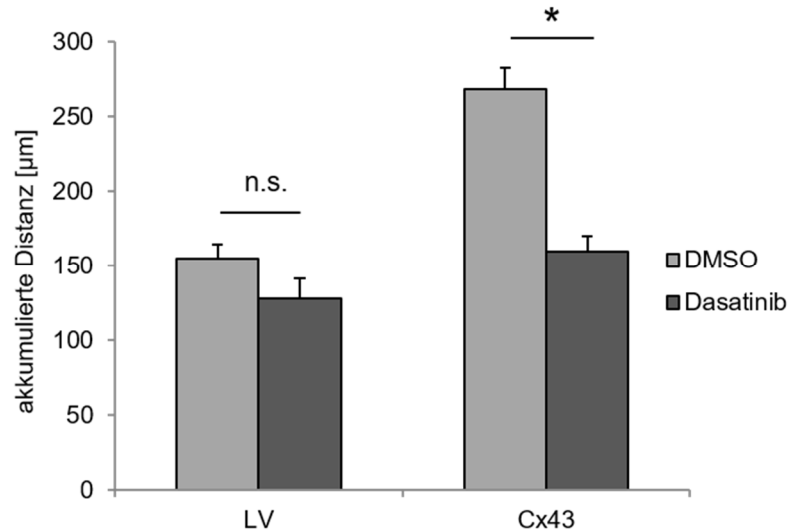


Abb. 11: Migration von HeLa-Zellen bei Inhibierung von Src. Die Migration von HeLa LV- und Cx43-exprimierenden Zellen wurde 24 h lang nach Zugabe von Dasatinib (30 nM) untersucht. Die Inhibierung von Src durch Dasatinib führte zu einer signifikant reduzierten Migration in Cx43-exprimierenden Zellen, wohingegen Dasatinib keinen Effekt auf LV-Zellen hatte. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4 unabhängige Experimente, (*) p = 0,001 (t-test); n.s. = nicht signifikant).

Repräsentative Pfade von migrierenden Einzelzellen sind in Abb. 12A dargestellt und verdeutlichen die erhöhte, aber ungerichtete Migration der Cx43-PKA-Zellen im Vergleich zu LV-Zellen und Cx43-Zellen. Die Analyse der Richtungsabhängigkeit bestätigte die signifikante Reduktion der Direktionalität von Cx43-PKA-Zellen (Direktionalität, MW ± SEM: LV: $0,74 \pm 0,02$; Cx43: $0,65 \pm 0,03$; und Cx43-PKA: $0,26 \pm 0,01$; Abb. 12B).

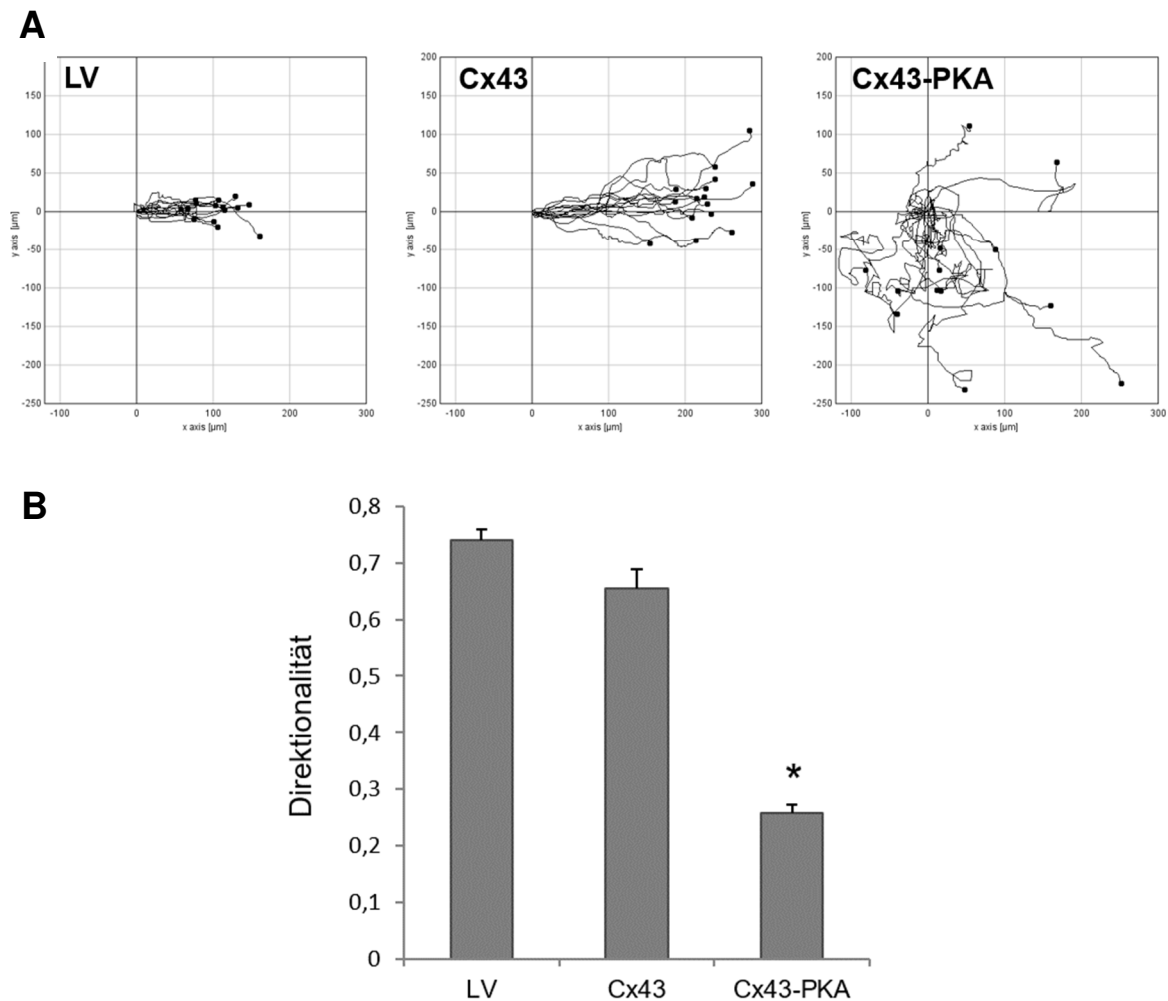


Abb. 12: Cx43-PKA führt zu einer gesteigerten, aber ungerichteten Migration in HeLa-Zellen. (A) Repräsentative Pfade von migrierenden Einzelzellen. **(B) Direktionalität von LV, Cx43 und Cx43-PKA-Zellen nach 24 h Migration im Wundassay.** Die Direktionalität (Quotient aus euklidischer und akkumulierter Distanz) von Cx43-PKA-Zellen war im Vergleich zu Cx43 und LV-Zellen signifikant reduziert. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt. (n = 5-7 unabhängige Experimente; (*) $p \leq 0,05$ vs. Cx43; einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

Um die Effekte auf die Direktionalität mit einer weiteren Methode zu überprüfen, wurde die Ausrichtung des Golgi-Apparates bei migrierenden Zellen untersucht. Nach Immunfluoreszenzfärbung des Golgi-Matrixproteins GM 130 und des Zellkerns wurde der Anteil der Zellen mit Golgi in Vorwärtsorientierung in Bezug auf alle migrierenden Zellen an der Zellfront ausgewertet (Abb. 13). Der Golgi-Apparat war bei LV und Cx43-Zellen in den meisten Zellen vor dem Nukleus in Migrationsrichtung orientiert. Im Vergleich dazu, war bei Cx43-PKA-Zellen die Zahl der Zellen mit Golgi-Orientierung in Migrationsrichtung signifikant reduziert (Prozentualer Anteil der Zellen mit Golgi-Orientierung in Migrationsrichtung, MW \pm SEM: LV: 59 ± 1 %; Cx43: $63 \pm 0,8$ %; Cx43-PKA: 46 ± 1 %; Abb. 13B).

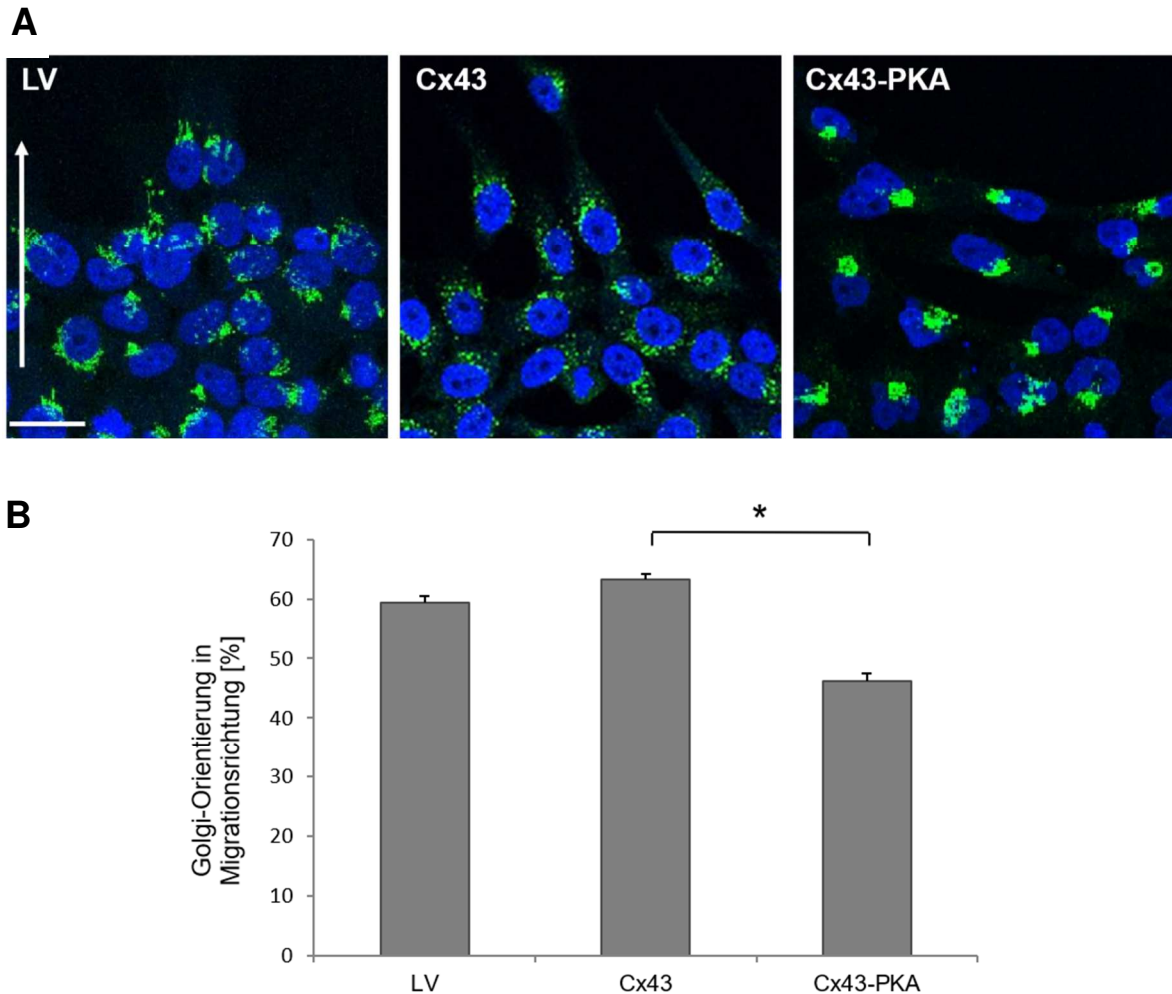


Abb. 13: Golgi-Orientierung in migrierenden Zellen. (A) Repräsentative Aufnahmen nach immunzytochemischer Färbung des Golgi-Matrixproteins GM-130 (AF488; grün) und Anfärbung des Zellkerns mit TO-PRO-3 (blau) von migrierenden HeLa LV, Cx43 und Cx43-PKA-Zellen 16 h nach Migration. Bei HeLa LV und Cx43-Zellen war der Golgi-Apparat, relativ zum Nukleus gesehen, häufiger in Richtung des Migrationsspaltes angeordnet als bei Cx43-PKA-Zellen. Maßstabsbalken: 20 μ m. Pfeil: Migrationsrichtung. (B) Quantitative Auswertung der Golgi-Orientierung. Der Anteil der Cx43-PKA Zellen mit Golgi-Orientierung in Migrationsrichtung war signifikant niedriger im Vergleich zu LV und Cx43-Zellen. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4 unabhängige Experimente, (*) $p \leq 0,001$ vs. Cx43; einfaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

1.5 Einfluss der Cx43-Mutationen auf die Filopodienbildung

Die Zellmigration ist durch permanenten Umbau des Aktinzytoskeletts gekennzeichnet. Vorangegangene Arbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass die verstärkte Migration bei Expression von Cx43 bzw. des C-terminalen Bereichs mit einer Steigerung der Filopodienanzahl einhergeht (Kameritsch et al., 2015). Um den Einfluss der Cx43-Mutationen auf die

Migrations-assoziierte Anzahl der Filopodien zu untersuchen, wurden die Zellen 3 h mit 10% Serum (NBCS) stimuliert und das Aktinzytoskelett gefärbt. Die mit Cx43-SH2, Cx43-SH3 oder der Doppelmutante Cx43-SH2-SH3 transfizierten HeLa-Zellen zeigten im Vergleich zu LV-Zellen keine signifikante Änderung der Filopodienanzahl (Abb. 14A). (Filopodienanzahl pro Zelle, Median: LV: 2,6; Cx43: 13,8; Cx43-SH2: 3,7; Cx43-SH3: 4,6; Cx43-SH2-SH3: 4,5; Abb. 14B). Im Gegensatz dazu zeigten Cx43-Zellen und Cx43-PKA-Zellen eine signifikant erhöhte Anzahl an Filopodien im Vergleich zu LV-Zellen (PKA: 9,7).

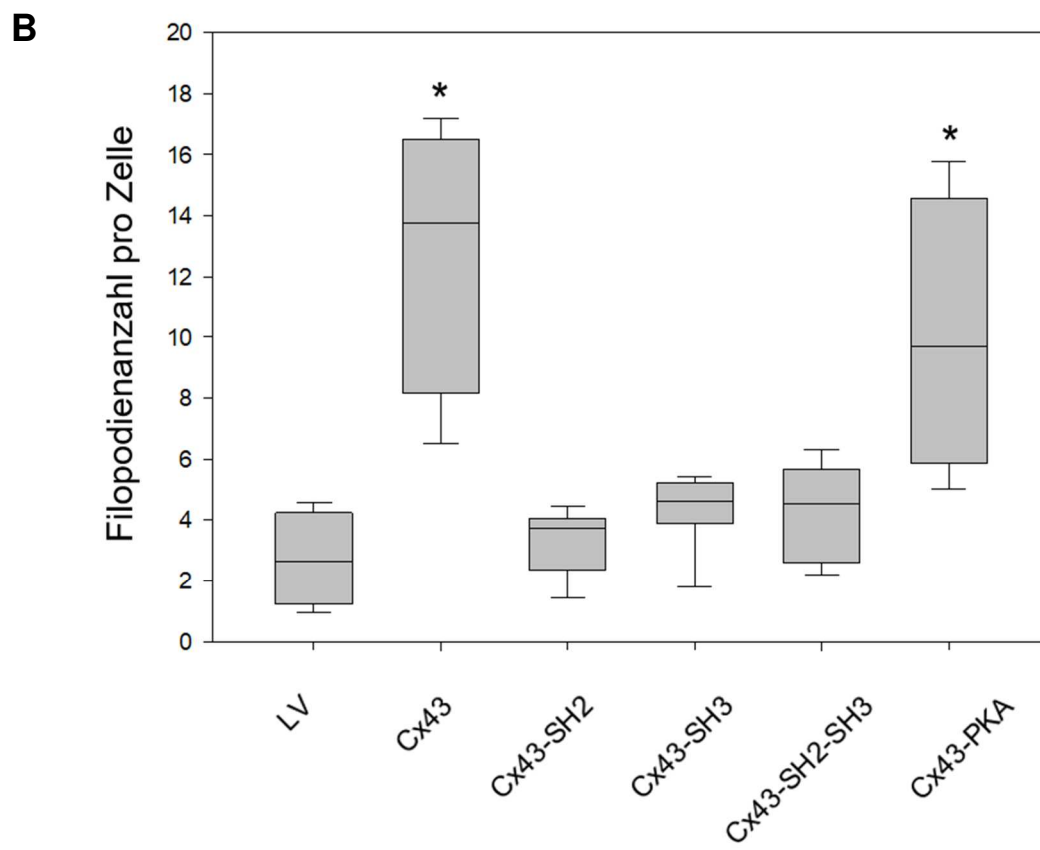
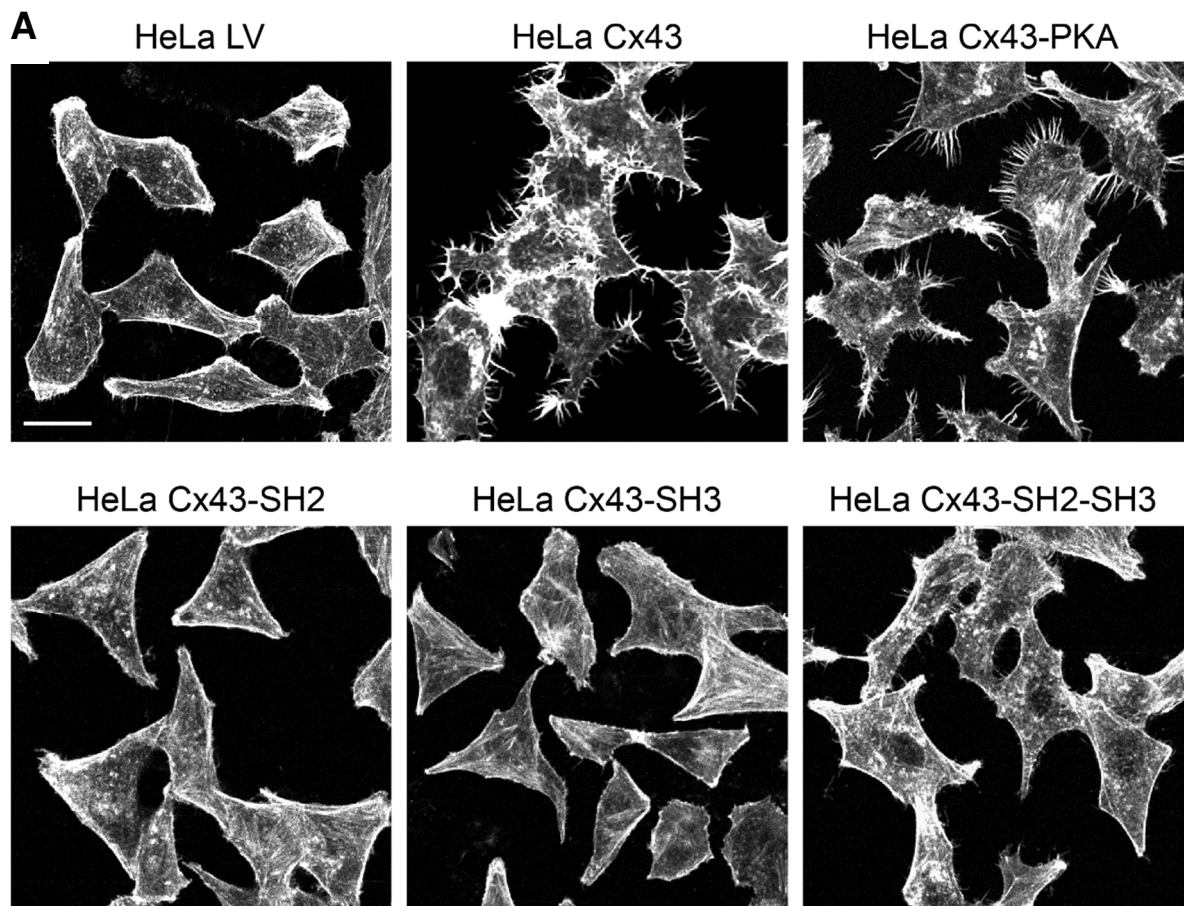


Abb. 14: Filopodienbildung von HeLa Zellen, die Cx43 oder mutierte Cx43-Proteine exprimieren. (A) F-Aktin-Färbung (Phalloidin-AF546) von HeLa-Zellen, die für 24 h in Hungermedium (0% NBCS-Medium) kultiviert und anschließend für 3 h mit 10% NBCS-Medium stimuliert wurden. HeLa LV, Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 Zellen zeigten signifikant weniger Filopodien pro Zelle im Vergleich zu HeLa Cx43 Zellen. Bei HeLa Cx43-PKA-Zellen war ein ähnlicher Phänotyp wie bei HeLa Cx43 zu beobachten. Maßstabsbalken: 10 µm. **(B) Quantitative Auswertung der Filopodienanzahl von HeLa Cx43 und Cx43-Mutanten Zellen.** HeLa Cx43 und Cx43-PKA zeigten eine signifikant erhöhte Filopodienanzahl im Vergleich zu HeLa LV. Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 zeigten dagegen keine signifikante Änderung bei der Anzahl an Filopodien im Vergleich zu LV-Zellen. (n = 4-7 unabhängige Experimente; je 18 zufällig ausgewählte Zellen pro Experiment wurden analysiert; (*) p ≤ 0,05 vs. LV; Kruskal-Wallis einfaktorielle Varianzanalyse on ranks gefolgt von der Dunn's Methode).

2 Rolle der PKA für die Cx43-vermittelte Migrationssteigerung

2.1 Auswirkungen der Aktivierung bzw. Inhibierung von PKA auf die Zellmigration

Da die Substitution der Serine S364, S369 und S373 der PKA-Phosphorylierungsstellen zu einer gesteigerten, aber ungerichteten Migration führte, wurde der Einfluss von PKA auf die Migration genauer untersucht. Zur Aktivierung von PKA wurde Forskolin (FSK; 10 µM), welches die Adenylcyclase stimuliert und darüber den cAMP-Spiegel erhöht, verwendet. Die Stimulation mit FSK verminderte die Migration bei HeLa Cx43-Zellen signifikant, hatte aber keinen Einfluss auf die Migration von LV- und Cx43-PKA-Zellen. Bei diesen Zellen war die Migration unter FSK-Stimulation gleich der unter Kontrollbehandlung (DMSO) (akkumulierte Distanz, MW ± SEM: LV + DMSO: 168 ± 7 µm; LV + FSK: 159 ± 13 µm; Cx43 + DMSO: 261 ± 13 µm; Cx43 + FSK: 194 ± 17 µm; Cx43-PKA + DMSO: 378 ± 15 µm; Cx43-PKA + FSK: 366 ± 25 µm; Abb. 15).

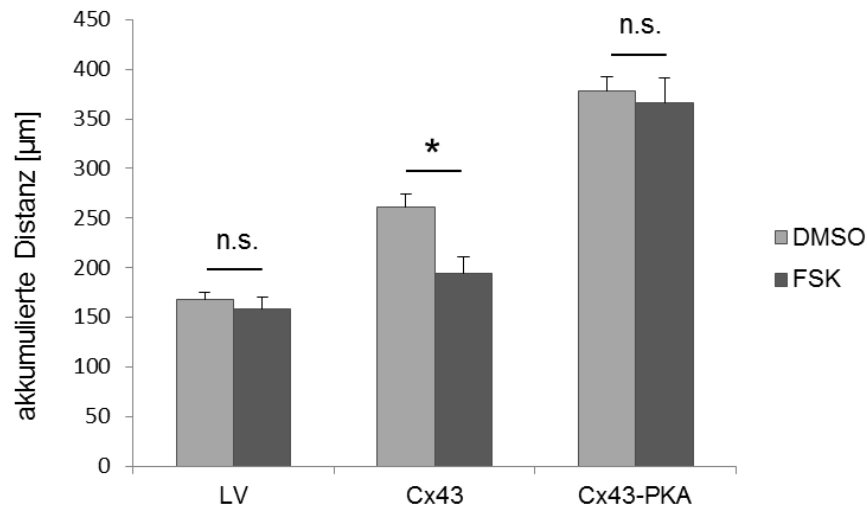


Abb. 15: Migration (akkumulierten Distanz) von HeLa-Zellen bei Aktivierung der PKA durch FSK. Die Migration von HeLa-Zellen, die LV, Cx43 oder Cx43-PKA exprimierten, wurde im Wundassay (nach 24 h) in Anwesenheit von FSK (10 µM) oder DMSO, als Kontrolle, untersucht. Cx43-Zellen zeigten eine signifikant reduzierte akkumulierte Distanz nach FSK-Stimulation verglichen mit der DMSO-Kontrolle. FSK hatte dagegen keinen Einfluss auf die Migration von LV- und Cx43-PKA-Zellen. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 3-4 unabhängige Experimente, (*) $p \leq 0,05$ (t-test) $p \leq 0,006$ (zweifaktorielle ANOVA gefolgt von der Holm-Sidak Methode) vs. Cx43 + DMSO; n.s. = nicht signifikant).

Die pharmakologische Inhibierung von PKA mit einem PKA Inhibitor (PKI; 30 µM) führte zur signifikanten Steigerung der akkumulierten Distanz bei HeLa Cx43. Im Gegensatz dazu hatte die Behandlung mit PKI ebenso keinen Einfluss auf die Migration von LV- und Cx43-PKA-Zellen (akkumulierte Distanz, MW ± SEM: LV: 192 ± 29 µm; LV + PKI: 190 ± 20 µm; Cx43: 237 ± 13 µm; Cx43 + PKI: 314 ± 14 µm; Cx43-PKA: 438 ± 16 µm; Cx43-PKA + PKI: 422 ± 18 µm; Abb. 16).

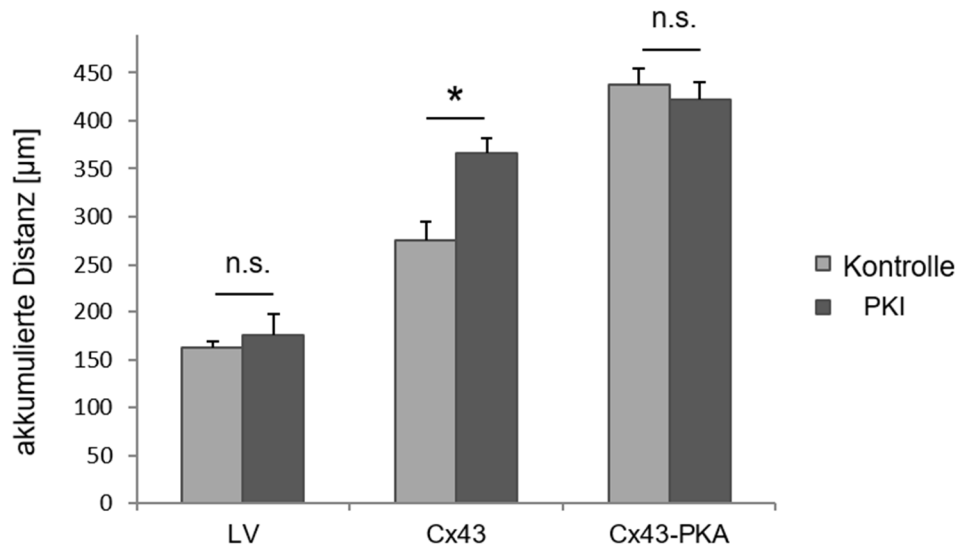


Abb. 16: Migration (akkumulierten Distanz) von HeLa-Zellen bei Inhibierung der PKA durch den Inhibitor PKI. Die Migration von HeLa-Zellen, die LV, Cx43 oder Cx43-PKA exprimierten, wurde 24 h nach Zugabe von PKI (30 µM) untersucht. Die Inhibierung von PKA durch PKI führte zu einer signifikant gesteigerten Migration in Cx43-exprimierenden Zellen, wohingegen PKI keinen Effekt auf die Migration von LV- und Cx43-PKA-Zellen hatte. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4-5 unabhängige Experimente, (*) p = 0,004 (t-test) p = 0,005 (ANOVA) vs. Cx43 - PKI; n.s. = nicht signifikant).

Da die Richtungsabhängigkeit in Cx43-PKA-Zellen signifikant reduziert war, wurde der Einfluss von PKA auf die gerichtete Migration untersucht. Die Inhibierung von PKA mit PKI resultierte in einer Reduktion der Direktionalität von Cx43-exprimierenden Zellen. Dagegen hatte die Zugabe von PKI keinen Einfluss auf die Direktionalität von LV und Cx43-PKA Zellen (Abb. 17).

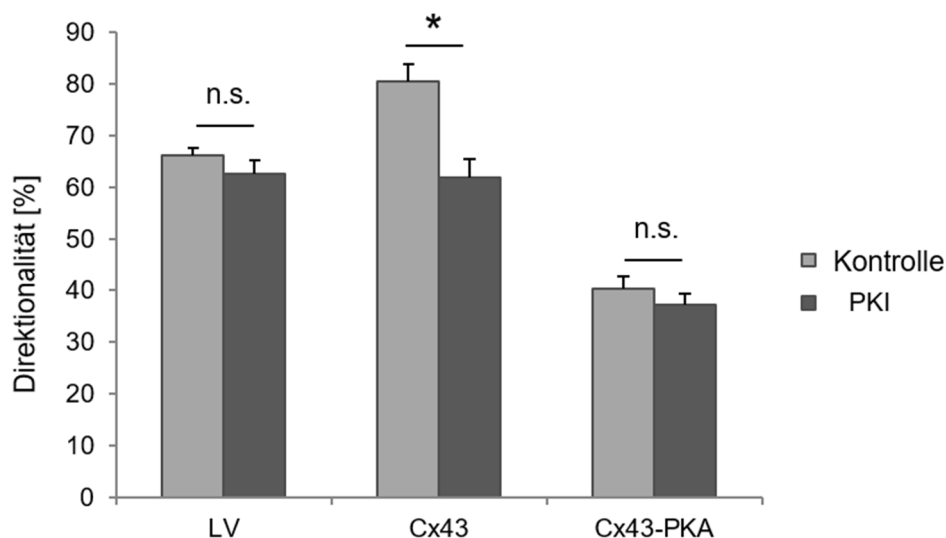


Abb. 17: Analyse der Direktionalität von HeLa-Zellen unter PKI-Behandlung. Die Migration von HeLa Zellen, die LV, Cx43 oder Cx43-PKA exprimierten, wurde nach Zugabe von PKI (30 µM) im Waundassay

(24 h) analysiert. Cx43-Zellen zeigten eine signifikant erniedrigte Direktionalität nach PKI-Behandlung verglichen mit Cx43 Zellen ohne PKI, wohingegen die Migration von LV- und Cx43-PKA-Zellen nicht von der PKA-Inhibierung beeinflusst wurde. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4-5 unabhängige Experimente, (*) p = 0,004 (t-test) p= 0,005 (2 way ANOVA) vs. Cx43 - PKI; n.s. = nicht signifikant).

2.2 Die Aktivierung der PKA reduzierte die Filopodienbildung von Cx43-exprimierenden Zellen

Da die FSK-Stimulation die Zellmigration von Cx43-Zellen signifikant reduzierte, wurde die Filopodienbildung nach FSK-Behandlung untersucht. Dazu wurde das Aktinzytoskelett von LV-, Cx43- und Cx43-PKA-Zellen nach Migration im Wundassay unter FSK-Stimulation (10 μ M) bzw. Kontrollbedingungen (DMSO) mit Phalloidin-AF546 gefärbt und die Filopodien der Zellen an der Migrationsfront ausgewertet. Cx43-exprimierende Zellen bildeten nach Zugabe von FSK signifikant weniger Filopodien im Vergleich zu Zellen, die mit DMSO behandelt wurden, wohingegen die Filopodienanzahl in LV- und Cx43-PKA-Zellen unverändert blieb (Filopodienanzahl pro Zelle MW \pm SEM: LV + DMSO: $2,6 \pm 0,2$; LV + FSK: $2,5 \pm 0,2$; Cx43 + DMSO: $8,2 \pm 0,8$; Cx43 + FSK: $4,2 \pm 0,5$; Cx43-PKA + DMSO: $3,4 \pm 0,3$; Cx43-PKA + FSK: $3,0 \pm 0,3$; Abb. 18B). Repräsentative Aufnahmen der Filopodienbildung der migrierenden Zellen nach FSK-Stimulation und unter Kontrollbedingungen sind in Abb. 18A dargestellt.

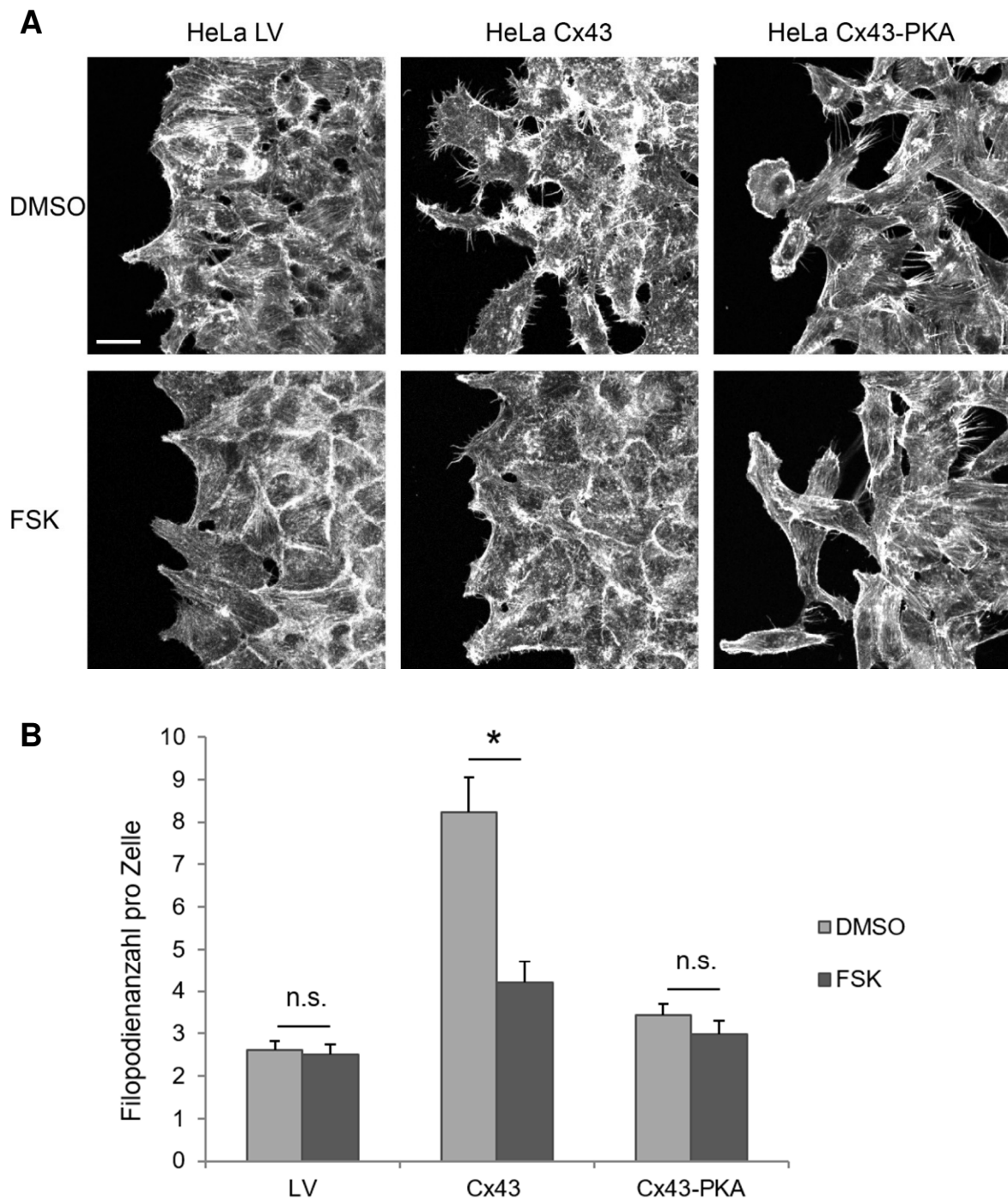


Abb. 18: Filopodienbildung von HeLa-Zellen nach 16 h Migration unter Zugabe von FSK bzw. DMSO. (A) Repräsentative Bilder von HeLa-Zellen, die LV, Cx43 oder Cx43-PKA exprimierten, sind dargestellt. Die Zellen wurden nach 16 h Migration mit DMSO- oder FSK-Behandlung fixiert und das Zytoskelett mit Phalloidin-AF546 gefärbt. Cx43 Zellen bildeten nach Zugabe von FSK signifikant weniger Filopodien an der Migrationsfront im Vergleich zu DMSO-behandelten Zellen. LV und Cx43-PKA Zellen wiesen dagegen keinen Unterschied bei der Filopodienbildung nach FSK-Behandlung auf. Maßstabsbalken: 20 μ m. (B) Die quantitative Auswertung der Filopodienbildung zeigte eine signifikant reduzierte Filopodienanzahl bei Cx43-Zellen nach FSK-Stimulation (10 μ M) im Vergleich zu DMSO-Behandlung. Dagegen hatte FSK keinen Effekt auf LV und Cx43-PKA exprimierende Zellen. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 3 unabhängige Experimente; 20-40 zufällig ausgewählte Zellen pro Experiment wurden analysiert, (*) p = 0,01 vs. Cx43 + DMSO; n.s. = nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

2.3 Einfluss der PKA-Phosphorylierungsstellen auf Cx43-Interaktionen mit PKA, VASP und IRSp53

Um zu untersuchen, ob der Austausch von drei Serinen (364, 369 und 373) in der PKA-Phosphorylierungsstelle von Cx43 einen Einfluss auf die Bindung von PKA und Cx43 hat, wurden Immunpräzipitationen (IP) durchgeführt. HeLa-Zellen, die LV, Cx43 oder Cx43-PKA exprimierten, wurden 15 min mit FSK (10 μ M) stimuliert oder mit DMSO als Kontrolle behandelt. In Cx43-exprimierenden HeLa-Zellen wurde eine starke Interaktion von PKA mit Cx43 beobachtet, welche durch FSK-Stimulation zusätzlich erhöht wurde. Im Gegensatz dazu war die Bindung von PKA an das mutierte Cx43-PKA signifikant niedriger und wurde nicht durch die Stimulation mit FSK beeinflusst. In LV transfizierten Zellen, die als Negativkontrolle dienten, konnte keine Bindung nachgewiesen werden (Abb. 19).

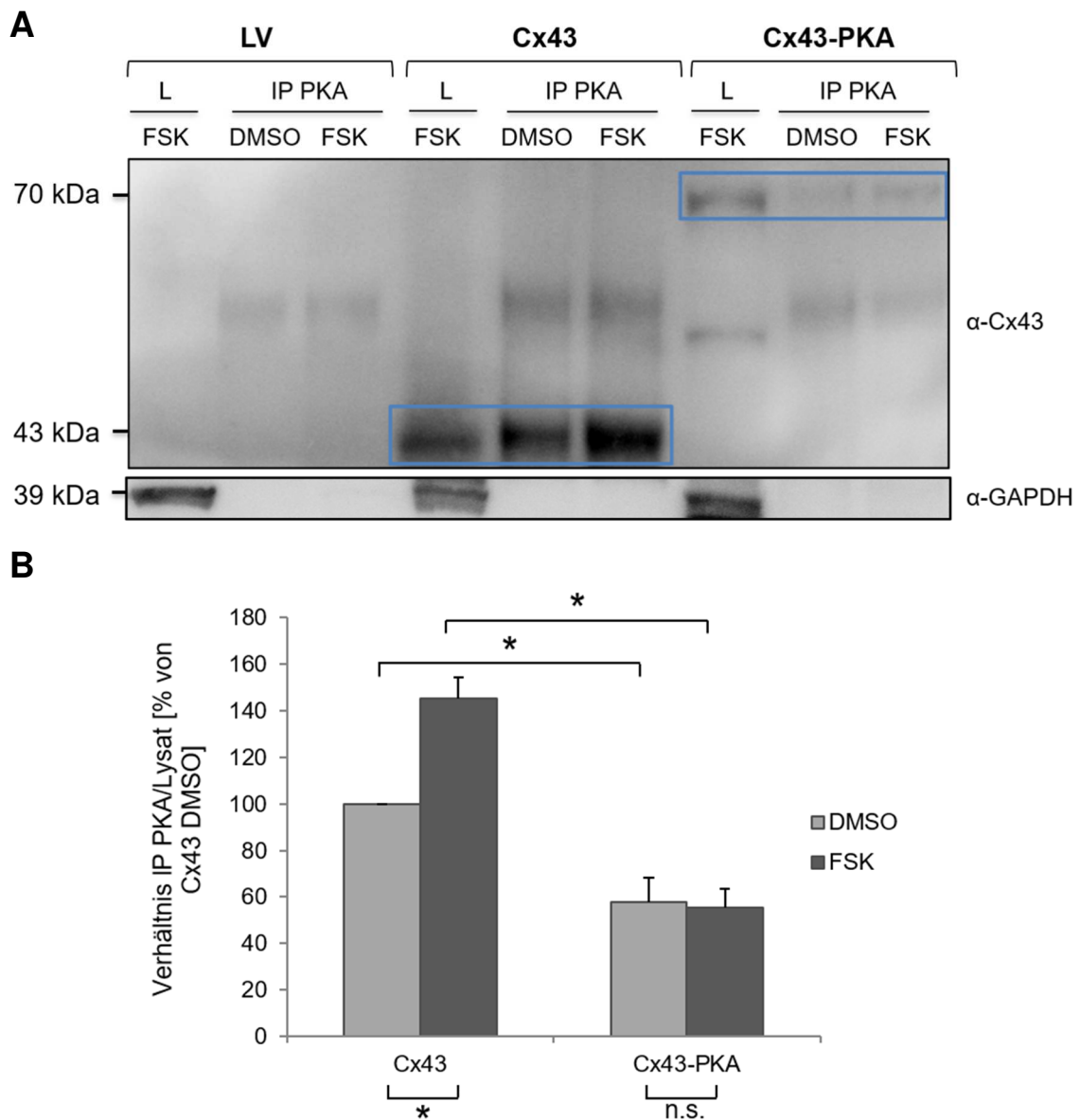


Abb. 19: Protein-Protein-Interaktion von Cx43 mit PKA. (A). Die Immunpräzipitationen (IP) von PKA aus Zelllysaten von LV, Cx43 und Cx43-PKA exprimierenden Zellen, die entweder für 15 min mit FSK oder DMSO behandelt waren, wurden mit einem polyklonalen anti-PKA C- α Antikörper durchgeführt. Die Bindung an Cx43 wurde im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper analysiert. Die jeweiligen Zelllysate (L) dienten als Expressionskontrolle. Bei LV Zellen, die kein Cx43 exprimieren, war keine Bindung nachweisbar. Die Bindung von PKA an Cx43 verstärkte sich durch Stimulation mit FSK, während das mutierte Cx43-PKA-Protein nur eine schwache Bindung zeigte, die nicht durch FSK erhöht wurde. GAPDH diente als Kontrolle und wurde nur in den Zelllysaten nachgewiesen, aber präzipitierte nicht mit PKA. **(B)** Quantitative Auswertung der Interaktion von Cx43 und Cx43-PKA mit PKA nach FSK-Stimulation verglichen mit unstimulierten (DMSO) Zellen. Die Bindung von PKA (Verhältnis IP/Lysat) ist im Vergleich zur Kontrolle (Cx43 DMSO = 100%) angegeben. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 3 unabhängige Experimente; (*) $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

Zusätzlich wurde eine potentielle Protein-Protein-Interaktion zwischen Cx43 und VASP, einem Effektorprotein von PKA, untersucht. Mittels IP konnte gezeigt

werden, dass nicht nur PKA, sondern auch VASP an Cx43 bindet (Abb. 20). Die Interaktion von VASP mit Cx43 war nach Aktivierung der PKA durch Stimulation mit FSK ebenso verstärkt. Dagegen führte die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstelle zu einer reduzierten Bindung von VASP, die auch nicht durch Stimulation mit FSK erhöht wurde (Abb. 20).

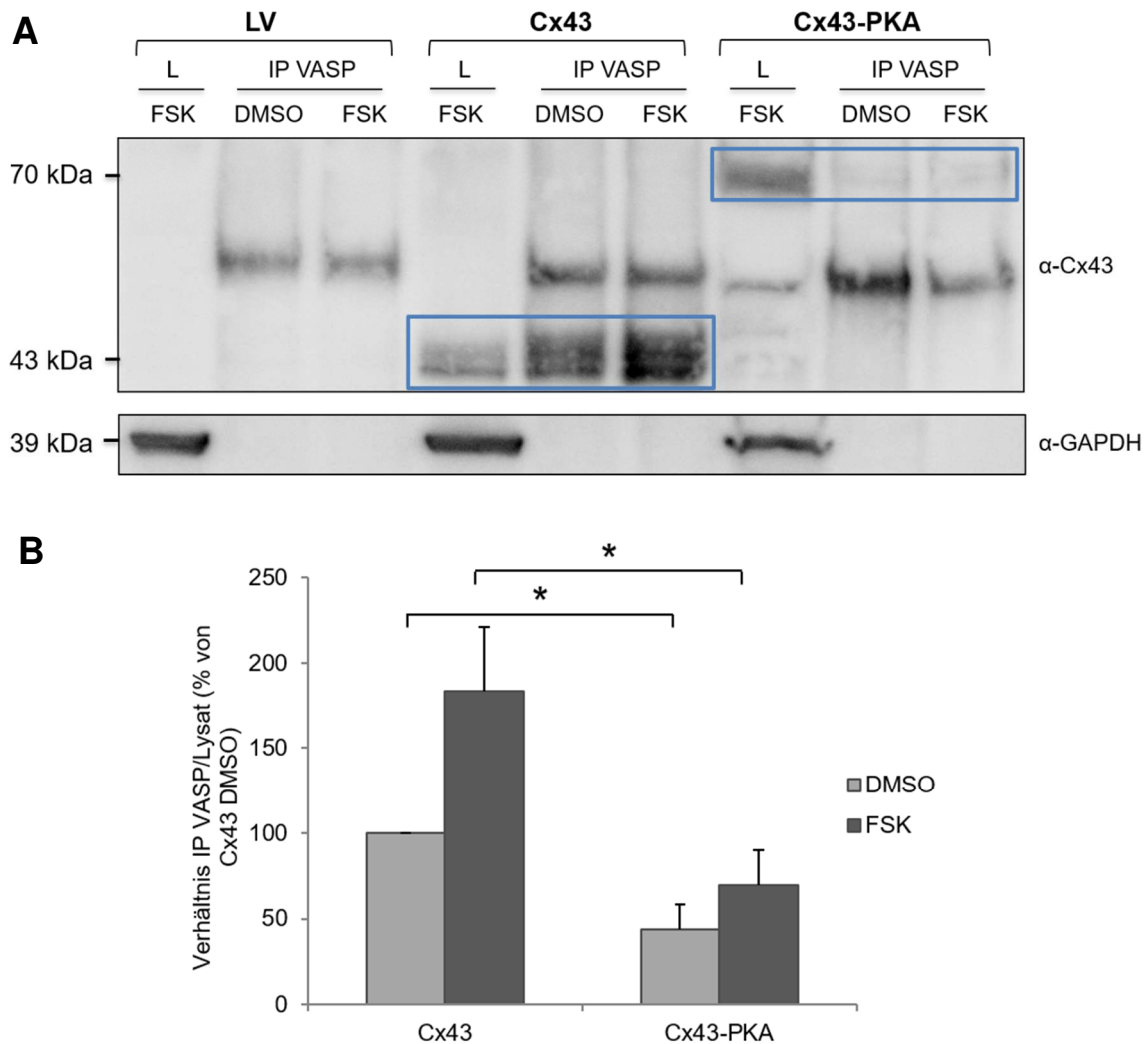
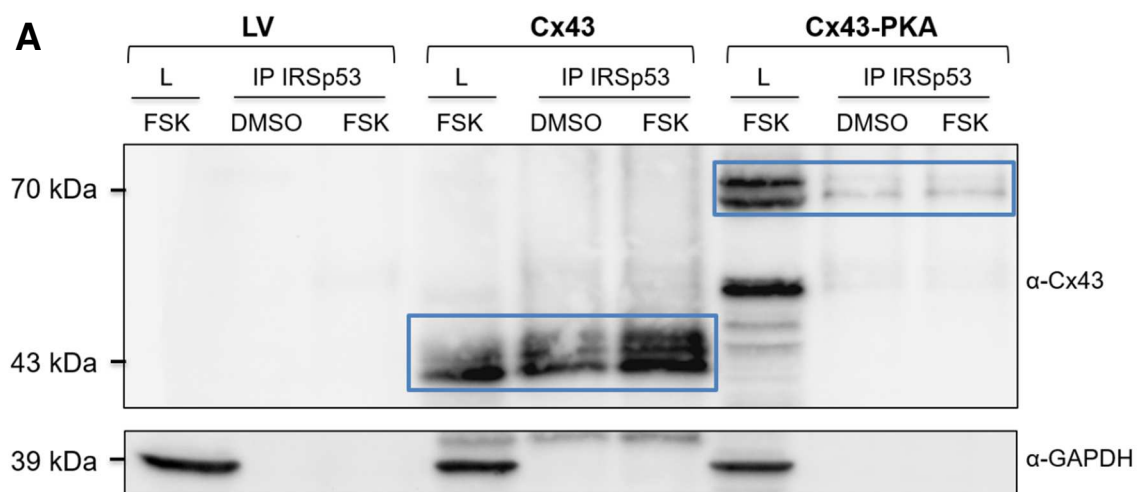


Abb. 20: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit Cx43. (A) Die IP von VASP aus Zelllysaten von LV, Cx43 und Cx43-PKA exprimierenden Zellen, die entweder für 15 min mit FSK oder DMSO behandelt waren, wurden mit einem monoklonalen anti-VASP Antikörper durchgeführt. Die Bindung an Cx43 wurde im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper analysiert. Die jeweiligen Zelllysate (L) dienen als Expressionskontrolle. Bei LV Zellen, die kein Cx43 exprimieren, war keine Bindung nachweisbar. Die Bindung von PKA an Cx43 verstärkte sich durch Stimulation mit FSK, während das mutierte Cx43-PKA-Protein nur eine schwache Bindung zeigte, die nicht durch FSK erhöht wurde. GAPDH diente als Kontrolle und präzipitierte nicht mit VASP. **(B)** Quantitative Auswertung der Interaktion von Cx43 und Cx43-PKA mit VASP nach FSK-Stimulation verglichen mit unstimulierten (DMSO) Zellen. Die Bindung von VASP (Verhältnis

IP/Lysat) ist im Vergleich zur Kontrolle (Cx43 DMSO = 100%) angegeben. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4 unabhängige Experimente; (*) $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

Da IRSp53 als Adapter eine Verbindung zwischen Membran, Aktinzytoskelett und Aktinzytoskelett-assoziierten Proteinen herstellen kann, wurde mittels IP untersucht, ob es ein mögliches Bindeglied zwischen dem Transmembranprotein Cx43 und dem an der Aktinpolymerisierung beteiligten Protein VASP darstellen könnte. In der Tat konnte eine Interaktion zwischen IRSp53 und Cx43 nachgewiesen werden, die durch FSK-Stimulation verstärkt wurde (Abb. 21). Die Interaktion mit mutiertem Cx43-PKA war deutlich schwächer und wurde nicht von FSK beeinflusst. In Kontrollzellen (LV) war keine Bindung nachweisbar, da diese Zellen kein Cx43 exprimieren (Abb. 21).



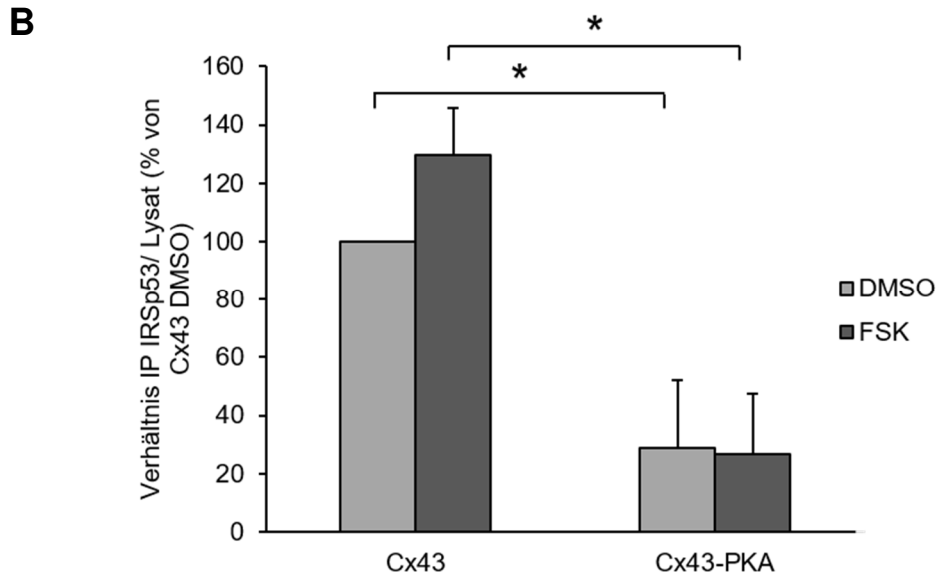


Abb. 21: Protein-Protein-Interaktion von IRSp53 mit Cx43. (A) Die IP von IRSp53 aus Zelllysaten von LV, Cx43 und Cx43-PKA exprimierenden Zellen, die entweder für 15 min mit FSK oder DMSO behandelt waren, wurden mit einem monoklonalen anti-IRSp53 Antikörper durchgeführt. Die Bindung an Cx43 wurde im Western Blot mit einem polyklonalen anti-Cx43 Antikörper analysiert. Die jeweiligen Zelllysate (L) dienen als Expressionskontrolle. Bei LV Zellen, die kein Cx43 exprimieren, war keine Bindung nachweisbar. Die Bindung von PKA an Cx43 verstärkte sich durch Stimulation mit FSK, während das mutierte Cx43-PKA-Protein nur eine schwache Bindung zeigte, die nicht durch FSK erhöht wurde. GAPDH diente als Kontrolle und war nur bei den Lysaten nachweisbar. (B) Quantitative Auswertung der Interaktion von Cx43 und Cx43-PKA mit IRSp53 nach FSK-Stimulation verglichen mit unstimulierten (DMSO) Zellen. Die Bindung von IRSp53 (Verhältnis IP/Lysat) ist im Vergleich zur Kontrolle (Cx43 DMSO = 100%) angegeben. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 3 unabhängige Experimente; (*) p ≤ 0,05; n.s. = nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

Als nächstes wurde untersucht, ob die Bindung von VASP an PKA ebenfalls durch die Expression von Cx43 bzw. Cx43-PKA verändert wird. Wie in Abb. 22 dargestellt, konnte PKA bei allen getesteten HeLa-Zellen unabhängig von der Cx43-Expression nach IP mit VASP detektiert werden.



Abb. 22: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit PKA. (A) Immunpräzipitationen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen VASP mit Zelllysaten von HeLa LV, Cx43 und Cx43-PKA nach DMSO bzw. FSK-Stimulation durchgeführt. Anschließende Western Blot Analyse mit einem polyklonalen Antikörper gegen PKA C- α zeigte keine signifikanten Unterschiede bei der Bindung von PKA an VASP zwischen den verschiedenen Zelllinien. GAPDH diente als Ladekontrolle.

Dagegen konnte eine verstärkte Bindung von VASP mit IRSp53 in Cx43-exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (Abb. 23). Die quantitative Analyse ergab, dass nach FSK-Stimulation eine signifikant stärkere Interaktion von VASP mit IRSp53 spezifisch in Cx43-Zellen erfolgte, im Vergleich zu LV- und Cx43-PKA-Zellen (Abb. 23).

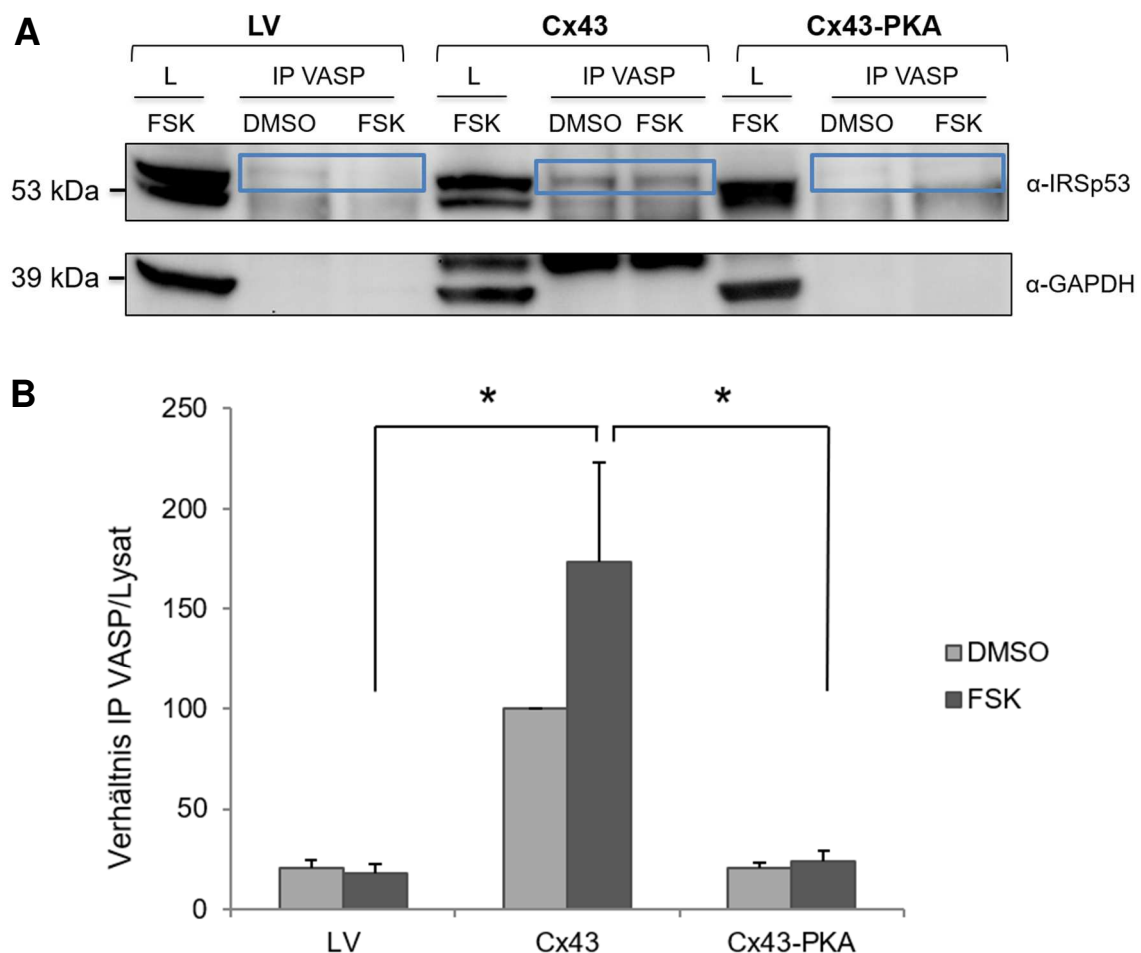


Abb. 23: Protein-Protein-Interaktion von VASP mit IRSp53. (A) Immunpräzipitationen wurden mit einem monoklonalen Antikörper gegen VASP mit Zelllysaten von HeLa LV, Cx43 und Cx43-PKA nach DMSO bzw. FSK-Stimulation durchgeführt. Anschließende Western Blot Analyse mit einem monoklonalen Antikörper gegen IRSp53 zeigte sowohl bei DMSO-Behandlung als auch bei FSK-Stimulation eine verstärkte Bindung von VASP an IRSp53 in Cx43-Lysaten im Vergleich zu LV- und Cx43-PKA-Lysaten. GAPDH diente als Ladekontrolle. **(B)** Quantitative Auswertung der Immunpräzipitationen mit VASP und IRSp53. Die Bindung von

VASP und IRSp53 (Verhältnis IP/Lysat) ist im Vergleich zur Kontrolle (Cx43 DMSO = 100%) angegeben. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 3 unabhängige Experimente; (*) $p \leq 0,05$; n.s. = nicht signifikant; zweifaktorielle Varianzanalyse gefolgt von der Holm-Sidak Methode).

2.5 Verstärkte VASP-Phosphorylierung in Cx43-exprimierenden Zellen nach PKA-Aktivierung

Es ist bekannt, dass phosphoryliertes VASP schlechter an Aktin binden kann und dessen fördernde Wirkung auf die Aktinpolymerisierung abgeschwächt wird (Harbeck et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002). Da eine verstärkte Bindung von VASP an Cx43 nach FSK-Stimulation nachgewiesen wurde, wurde untersucht, ob die verstärkte Bindung einen Einfluss auf die PKA-abhängige VASP-Phosphorylierung (S157) hatte. Stabil transfizierte LV-, Cx43- und Cx43-PKA HeLa-Zellen wurden mit FSK (10 μ M, 15 min) stimuliert und im WB analysiert. Bei allen Zellarten führte die Stimulation mit FSK zu einer verstärkten Phosphorylierung von VASP an S157 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 24). Allerdings war in Cx43-exprimierenden Zellen die PKA-abhängige VASP-Phosphorylierung im Vergleich zu Cx-defizienten Zellen (LV) und Zellen mit mutiertem Cx43-PKA signifikant erhöht (Abb. 24). Anhand dieser Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung von PKA (durch FSK) in Cx43-exprimierenden Zellen zu einer verstärkten VASP-Phosphorylierung führt, was mit einer verminderten Migration unter FSK einhergeht.

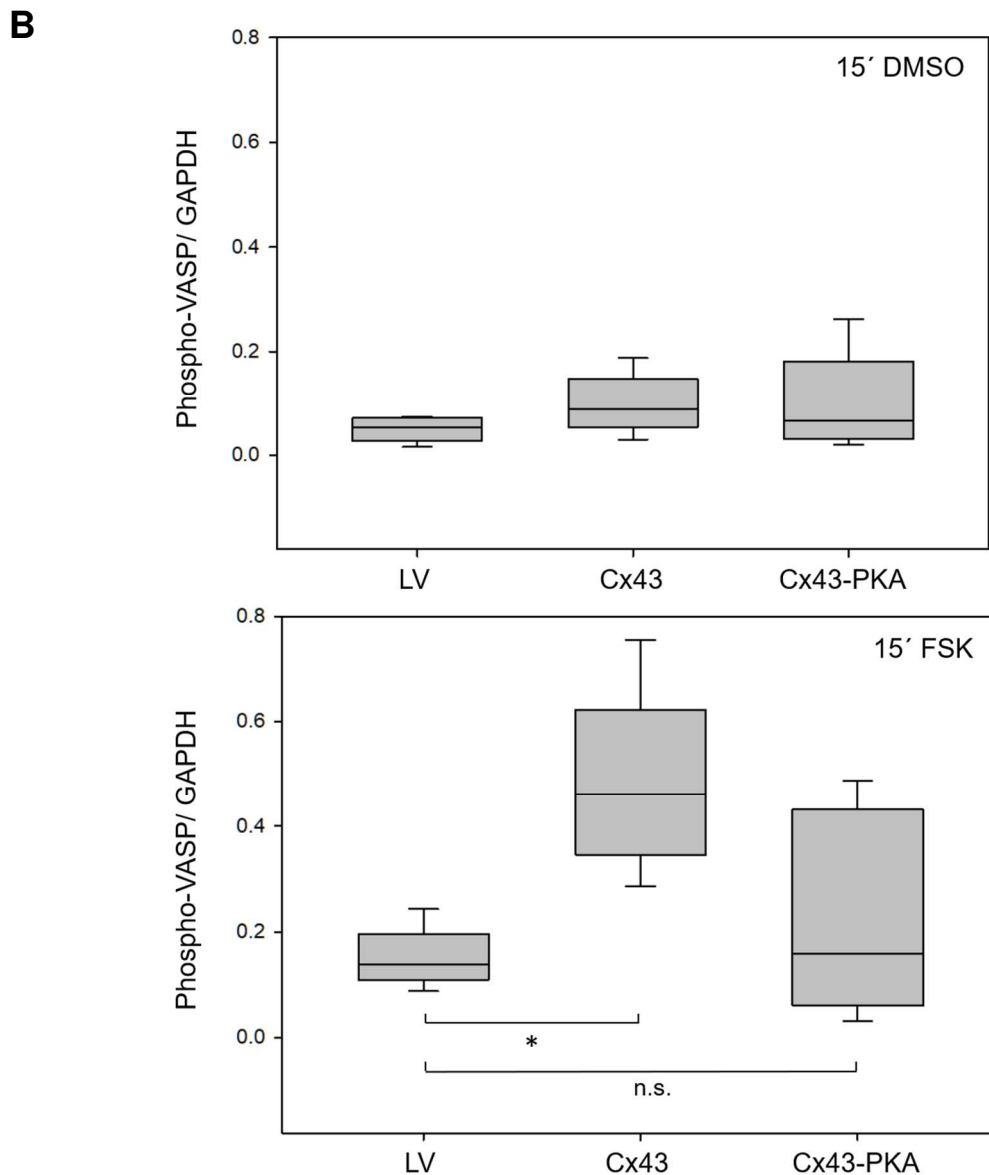
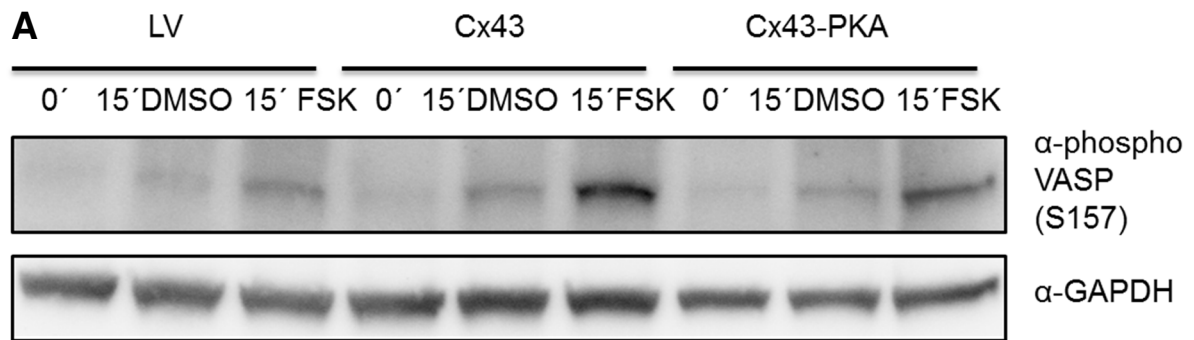


Abb. 24: Phosphorylierung von VASP (S157) in stabil transfizierten HeLa-Zellen. (A) Repräsentativer Western Blot der VASP-Phosphorylierung in LV-, Cx43- und Cx43-PKA-Zellen, die 15 min mit FSK (10 μ M) in Medium (10% NBGS) stimuliert bzw. mit DMSO als Kontrolle behandelt wurden. Die Phosphorylierung von VASP an S157 wurde im Western Blot mit einem polyklonalen Antikörper (α -phospho-VASP (S157)) analysiert. Der Nachweis von GAPDH diente als Ladekontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. (B) Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von VASP (S157) und Normalisierung auf

die GAPDH-Expression (phospho-VASP/GAPDH). Die FSK-stimulierte Phosphorylierung von VASP (S157) war bei Cx43-Zellen im Vergleich zu LV-Zellen signifikant erhöht, jedoch nicht signifikant in Cx43-PKA-Zellen. Die Daten sind als Boxplot dargestellt (n = 5 unabhängige Experimente; (*) p < 0,05 vs. LV 15' FSK; Kruskal Wallis einfaktorielle Varianzanalyse on ranks gefolgt von der Dunn's Methode).

Um nachzuweisen, dass die durch FSK induzierte VASP-Phosphorylierung von PKA abhängig ist, wurde ein spezifischer PKA-Inhibitor (PKI) eingesetzt. Die Zugabe von PKI reduzierte signifikant die FSK-induzierte VASP-Phosphorylierung an S157 in Cx43-Zellen, aber nicht in LV- und Cx43-PKA-Zellen (Abb. 25).

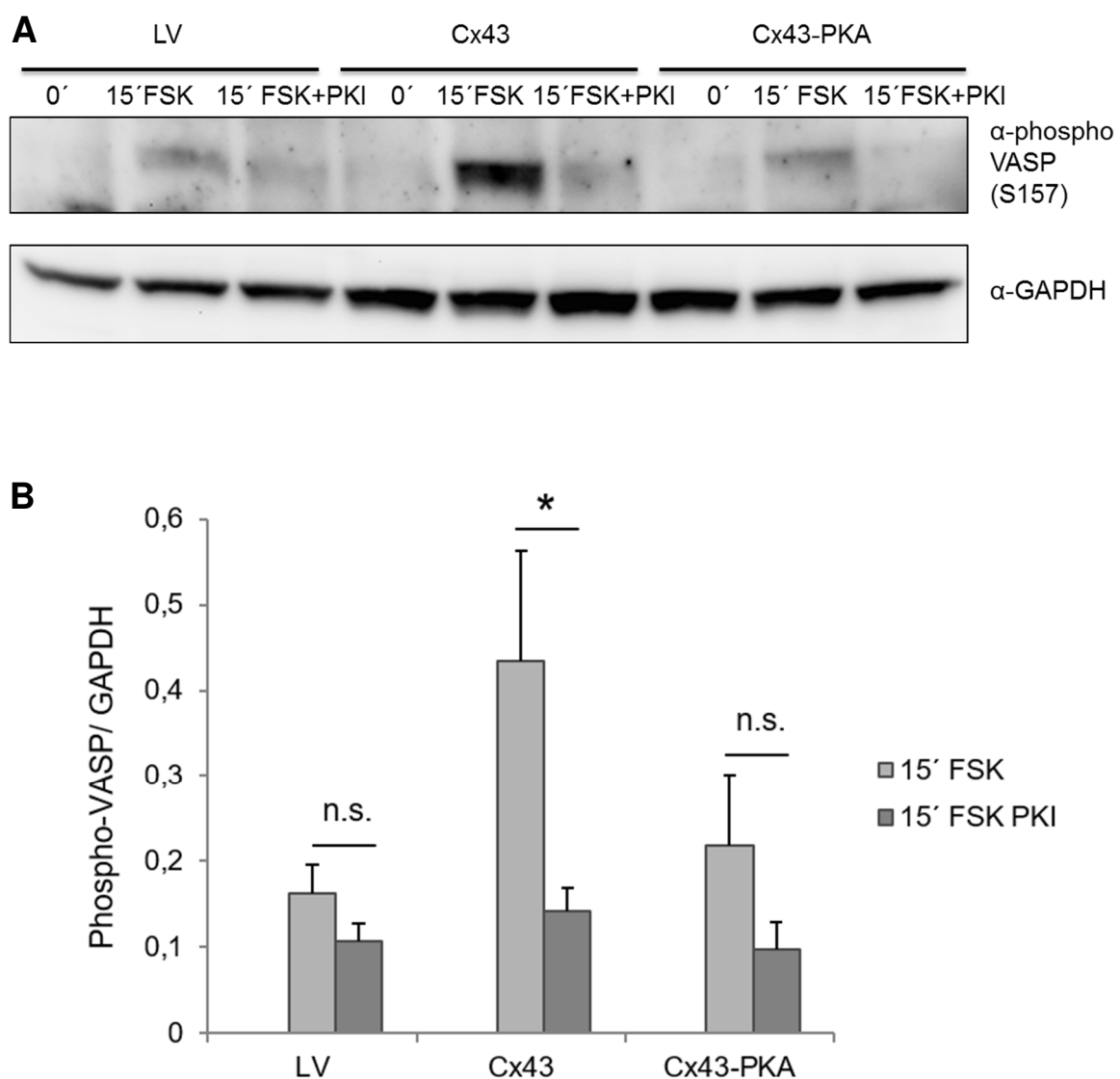


Abb. 25: VASP-Phosphorylierung (S157) nach Behandlung mit PKI. (A) Repräsentativer Western Blot der VASP-Phosphorylierung. Stabil transfizierte LV, Cx43 und Cx43-PKA HeLa-Zellen wurden für 15 min mit FSK (10 μ M) bzw. mit FSK und PKI (FSK PKI: 10 μ M FSK und 30 μ M PKI) inkubiert und die Zellextrakte im Western Blot mit einem polyklonalen phospho-VASP (S157) Antikörper analysiert. Als Kontrolle dienten

unbehandelte Zellen (0, nur DMEM-10% NBCS). GAPDH diene als Ladekontrolle, dass gleiche Proteinmengen aufgetragen wurden. **(B)** Densitometrische Auswertung der Phosphorylierung von VASP (S157) in relativen Einheiten, normalisiert auf die GAPDH-Expression (phospho-VASP/GAPDH). Die Hemmung von PKA durch PKI verminderte signifikant die FSK-induzierte Phosphorylierung von VASP (S157) in Cx43-Zellen, jedoch nicht in LV- und Cx43-PKA-Zellen. Die Daten sind als MW + SEM dargestellt (n = 4 unabhängige Experimente; (*) $p < 0,05$; t-Test).

IV Diskussion

1 Expression der Cx43-Mutanten

HeLa-Zellen sind im Vergleich zu anderen Zellen (wie Immunzellen) zwar weniger motil, eignen sich aber als Modell für die selektive Expression von Cx43 bzw. Cx43-Mutanten und deren Untersuchung, da diese in der Wildtyp-Form keine Connexine exprimieren (Elfgang et al., 1995) und weil die meisten Gewebe und Zelltypen mehr als ein Connexin exprimieren und Cx43 ubiquitär in fast allen Zellen exprimiert wird (Laird, 2006). Die migrationssteigernde Wirkung des C-terminalen Bereichs von Cx43 konnte in vorangehenden Studien auch in endothelilalen Vorläuferzellen (EPC) bestätigt werden (Behrens et al., 2010) und die Inhibierung der Migration durch PKA konnte auch in Endothelzellen (HMEC) beobachtet werden (Kameritsch et al., 2019). Die Cx43-Mutanten wurden am C-Terminus mit eGFP gekoppelt, was die Untersuchung der zellulären Lokalisierung ohne nachträgliche Fixierung und Färbung ermöglichte und zum Nachweis der Expression der mutierten Cx43-Proteine diente. Die Analyse der Lokalisierung der Cx43-Mutanten zeigte, dass die eGFP-gekoppelten Cx43-Mutanten in der gesamten Plasmamembran und vor allem an Zell-Zell-Kontakten zu finden waren, vergleichbar mit der Lokalisierung von Wildtyp-Cx43. Die Zell-Zell-Kopplungsversuchen zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen Cx43-Wildtyp und den Mutanten. Zellen, die die Mutanten Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 exprimierten, zeigten eine mit Cx43-Wildtyp Zellen vergleichbare GJ-Kommunikation. Die Cx43-PKA-Zellen zeigten tendenziell eine leichte Reduktion der Zellkopplung im Vergleich zu Cx43-Wildtyp-Zellen. Die PKA-Phosphorylierung im mutierten Bereich ist für den schnellen Aufbau neuer GJs, die Erhöhung der Stabilität der GJs und einer verstärkten GJ-Kommunikation von Bedeutung (Burghardt et al., 1995; Paulson et al., 2000; Shah et al., 2002; TenBroek et al., 2001). In Übereinstimmung mit diesen Befunden war nach Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen eine Tendenz zu reduzierter GJ-Kommunikation zu beobachten. Die Markierung mit eGFP scheint aber keinen wesentlichen Einfluss auf den Einbau in die Membran noch auf die GJ-Kommunikation auszuüben, da die Cx43-Mutanten eine ähnliche Lokalisation und GJ-Kopplung wie Wildtyp-Cx43 zeigten. Auch in vorangegangenen Studien in

unserem Labor konnte kein negativer Einfluss der eGFP-Markierung von Cx43 auf die Lokalisierung oder dessen Funktion festgestellt werden (Behrens et al., 2010; Kameritsch et al., 2015). Zudem wurde gezeigt, dass die Proteinsortierung von Cx43-GFP der von Wildtyp-Cx43 ähnelt und das so markierte Connexin funktionelle GJ-Kanäle bildet (Falk, 2000).

2 Die Migrationssteigerung von Cx43 wird durch die SH2- und SH3-Bindedomäne vermittelt

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Phosphorylierung von Cx43 durch Src mit einer verminderten GJ-Kopplung assoziiert ist (Lin et al., 2001). Ob die Bindung von Src an die SH2- und SH3-Bindedomänen und die Phosphorylierung von Cx43 an der Cx43-vermittelten Migrationssteigerung involviert ist, wurde bisher noch nicht untersucht.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass die Mutationen der SH2- und SH3-Bindedomäne und Src-Phosphorylierungsstelle von Cx43 zur signifikanten Reduktion der Zellmigration führt. Dies konnte durch die Inhibierung von Src mit Dasatinib, was zur Inhibierung der Migration in Cx43-exprimierenden Zellen führte, bestätigt werden. Src ist bei vielen Signalwegen, die an der Zellmigration und Zytoskelettorganisation beteiligt sind, involviert (Frame et al., 2002; Huveneers and Danen, 2009). Beispielsweise bildet Src mit der Fokalen Adhäsionskinase (FAK) einen Komplex, welcher den dynamischen Auf- und Abbau von fokalen Adhäsionen, welche für die Migration essentiell sind, reguliert (Fincham and Frame, 1998). Dagegen führt ein gestörter „turnover“ der Adhäsionen zur Reduktion der Migration (Ilic et al., 1995). In dem fokalen Adhäsionskomplex befinden sich noch weitere Proteine, wie das Adapterprotein Paxillin, welches ebenfalls von Src phosphoryliert werden kann und zur Regulation der Zelladhäsionen beiträgt (Webb et al., 2004). Wenn Paxillin nicht phosphoryliert werden kann, ist der Abbau der Adhäsionen gestört und die Migration wird behindert (Webb et al., 2004). Die Migration neuronaler Zellen wird durch Src kontrolliert, indem Src FAK und Cofilin mittels Phosphorylierung aktiviert, wodurch die Adhäsion und F-Aktin-Dynamik der migrierenden Zellen reguliert wird (Wang et al., 2015). Außerdem wurde berichtet, dass die Src-Phosphorylierung von Cx43 an Tyrosin 247 die Bindung von Mikrotubuli an die Tubulin-Bindedomäne von Cx43

verhindert (Saidi Brikci-Nigassa et al., 2012). Die Interaktion von Cx43 mit Mikrotubuli erleichtert den intrazellulären Transport und den Aufbau von GJs (Johnson et al., 2002). Diese Interaktion ist auch für die Zellpolarität und gerichtete Migration von Bedeutung. Francis et al. zeigten, dass die Deletion der Tubulin-Bindedomäne in Cx43 zur Reduktion der Geschwindigkeit und Direktionalität der Migration führte (Francis et al., 2011). Die Phosphorylierung von Cx43 durch Src scheint eine wichtige Bedeutung für die Zellmigration, möglicherweise im Zusammenhang mit nachfolgenden Proteininteraktionen zu haben. Beispielsweise führte die Src-vermittelte Phosphorylierung von Cx43 zur negativen Regulierung der Interaktion mit Drebrin, einem F-Aktin bindendem Protein (Ambrosi et al., 2016). Aber auch ohne die Beteiligung von Src, könnte die Bindung von Proteinen mit SH2- bzw. SH3-Domänen an Cx43 durch die eingeführten Mutationen verhindert werden und somit die Migration beeinträchtigen. Zahlreiche Proteine, die an der Signaltransduktion oder Aktinreorganisation beteiligt sind, besitzen eine SH2- oder SH3-Domäne, die ihnen eine Interaktion mit Cx43 ermöglichen könnte. Beispielsweise wurde eine Interaktion von Cortactin und Cx43 beobachtet (Squecco et al., 2006). Cortactin assoziiert mit F-Aktin und interagiert mit dem Arp2/3-Komplex, was die Bildung von Membranausstülpungen fördert, wodurch Cortactin die Zellmigration regulieren kann (Bryce et al., 2005; Weaver et al., 2001). Interessanterweise ist Cortactin ein Substrat von Src (Wu and Parsons, 1993). Die Phosphorylierung von Cortactin durch Src führt zur Reduzierung der Cortactin-vermittelten F-Aktin Vernetzung und hat negative Auswirkungen auf die Aktinpolymerisierung und Zellmigration (Huang et al., 1997; Lua and Low, 2005). He et al. Zeigten dagegen, dass Src und Cortactin die Dichte, Stabilität und Elongation von Filopodien verbessern. Hierbei förderte die Src-Phosphorylierung von Cortactin die Arp2/3-abhängige Aktinpolymerisierung und in den Filopodien werden die Aktinfilamentbündel von Src-phosphoryliertem Cortactin stabilisiert (He et al., 2015). Das stimmt mit den Befunden dieser Arbeit überein, da gezeigt werden konnte, dass die mit Cx43-SH2, Cx43-SH3 und Cx43-SH2-SH3 transfizierten Zellen im Vergleich zu Cx43-Zellen signifikant weniger Filopodien ausbildeten. Diese Mutationen scheinen die Signaltransduktion der Aktinpolymerisierung negativ zu beeinträchtigen. Cx43 könnte hier als Plattform dienen und die Interaktion von Src und Cortactin erleichtern. Dieser Zusammenhang wurde bereits bei der Bildung von Invadopodien in einer

Glioblastomzelllinie beobachtet (Chepied et al., 2020). Invadopodien sind zelluläre Ausstülpungen, die aus Proteinnetzwerken und Aktinfilamenten bestehen, und zum Abbau der extrazellulären Matrix führen, wodurch die lokale Invasion von Tumorzellen ermöglicht wird (Chepied et al., 2020). Bei der Bildung von Invadopodien ist ebenfalls die Aktinpolymerisierung involviert und somit wären Parallelen zur Filopodienbildung durch Cx43, Src und Cortactin denkbar. In einer anderen Studie wurde dagegen beobachtet, dass die Phosphorylierung von Tyrosin 247 und 265 in Cx43 und der Verlust der GJ-Kommunikation nicht bei der von v-Src vermittelten Migration involviert sind (Lin et al., 2006). Hier wurden allerdings Cx43-Knockout Fibroblasten untersucht, in denen Cx43-Mutanten exprimiert wurden, was zu den unterschiedlichen Beobachtungen führen könnte. Außerdem wurden die Zellen mit v-Src (viral; konstitutiv aktiv) infiziert, welches anders als endogenes Src reguliert wird. Src ist zudem bei vielen anderen Signalwegen, die das Aktinzytoskelett regulieren und zur Migration beitragen, involviert ist, welche hier überwiegen könnten (Lin et al., 2006). Außerdem muss in Betracht gezogen werden, dass Tyk2 ebenfalls Tyrosin 247 und 265 in Cx43 phosphorylieren kann, was dieselben Effekte wie die Src-Phosphorylierung auslöst (Inhibierung der GJ-Kommunikation und Inhibierung der Interaktion mit Tubulin) (Li et al., 2016). Tyk2 könnte somit auch einen Effekt auf die Migration ausüben, was die Interpretation der Src-Befunde erschwert.

3 Die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen führt zur Reduktion der Direktionalität

Dass die Phosphorylierung von Cx43 durch PKA zur gerichteten Migration beiträgt, lässt sich aus der bei Cx43-PKA Zellen im Vergleich zu Cx43-exprimierenden Zellen reduzierten Direktionalität der Migration schließen. In Übereinstimmung damit steht, dass die Inhibierung von PKA mit PKI in Cx43-Zellen ebenfalls zu einer Reduktion der Direktionalität führte. Somit scheint die PKA-abhängige Phosphorylierung von Cx43 die Zellpolarität zu beeinflussen und zu einer gerichteten Migration beizutragen. Die Untersuchung der Ausrichtung des Golgi-Apparates von migrierenden Zellen lieferte ebenfalls Hinweise auf eine verminderte Zellpolarität in Cx43-PKA-Zellen. Bei Cx43-PKA-Zellen war die Golgi-Orientierung im Vergleich zu Cx43-exprimierenden Zellen signifikant reduziert. Der

Golgi-Apparat ist bei wandernden Zellen in Migrationsrichtung ausgerichtet und befindet sich vor dem Nukleus (Millarte and Farhan, 2012). Diese Anordnung erleichtert den Transport von Proteinen, die für die Zellmigration benötigt werden, an die Zellfront (Mellor, 2004). Auch Filopodien tragen zur gerichteten Migration bei da sie verschiedene Signale in der Zellumgebung wahrnehmen und weiterleiten können (Mattila and Lappalainen, 2008). Deshalb wurde die Ausrichtung der Filopodien von migrierenden Zellen an der Migrationsfront untersucht. LV-Zellen bilden generell nur wenige Filopodien aus, was sich auch hier widerspiegelte. Cx43-Zellen wiesen im Vergleich dazu signifikant mehr Filopodien auf, die in Migrationsrichtung ausgerichtet waren. In Cx43-PKA-Zellen waren zwar ebenfalls mehr Filopodien als in LV-Zellen zu erkennen, jedoch waren diese kaum in Migrationsrichtung ausgerichtet. Dies lässt auf eine gestörte Zellpolarität und Ausrichtung des Aktinzytoskeletts bei der Cx43-PKA-Mutante schließen.

Viele Signalwege und Proteine können die Zellpolarität und gerichtete Migration beeinflussen, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch nicht vollständig aufgeklärt sind (Campanale et al., 2017; Etienne-Manneville, 2004; McCaffrey and Macara, 2012; Ridley et al., 2003). Auch PKA spielt bei der Polarität von migrierenden Zellen eine Rolle. Eine Studie berichtet, dass die Aktivierung von PKA an der Zellfront für die initialen Schritte der gerichteten Migration und die Aufrechterhaltung der Zellpolarität von Bedeutung ist (Lim et al., 2008a). Durch die Ligation von Integrinen ($\alpha 4 \beta 1$ und $\alpha 5 \beta 1$ Integrine) und mechanische Kräfte, vermittelt durch das Zytoskelett, wird die cAMP-Synthese am „leading edge“ angeregt, was dann zur Aktivierung von PKA führt (Lim et al., 2008a). Da Cx43 direkt mit Integrin $\alpha 5 \beta 1$ interagieren kann (Batra et al., 2012), wäre es möglich, dass Cx43 dort am „leading edge“ lokalisiert ist. Die Befunde lassen es denkbar erscheinen, dass PKA mit Cx43 einen Signalkomplex, gegebenenfalls mit weiteren Proteinen, bildet, der für die Polarisierung und Migrationssteuerung von Bedeutung ist. So hatte die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen eine reduzierte Interaktion von Cx43 mit PKA zur Folge und die Zellen wiesen eine reduzierte Direktionalität auf.

4 PKA reduziert die Cx43-vermittelte Zellmigration

Eigene Untersuchungen in unserem Labor zeigten, dass die migrationssteigernde Wirkung von Cx43 von der Anwesenheit des zytoplasmatischen C-terminalen Bereichs abhängt (Behrens et al., 2010), der an verschiedenen Stellen mit Proteinen interagieren und/ oder posttranslational modifiziert, wie z. B. durch die PKA phosphoryliert werden kann (Giepmans, 2004; Laird, 2010; TenBroek et al., 2001; Yogo et al., 2006; Yogo et al., 2002). Ob die Phosphorylierung von Cx43 durch PKA bei der migrationssteigernden Wirkung von Cx43 eine Rolle spielt, wurde bisher noch nicht untersucht. Diese Phosphorylierungen könnten sowohl beim vollen Cx43-Protein als auch bei den in HeLa-Zellen koexprimierten verkürzten Isoformen von Cx43 auftreten. Die am häufigsten exprimierte Isoform GJA1-20k beginnt bei Aminosäure 213 (Salat-Canela et al., 2014; Smyth and Shaw, 2013) und ist somit etwas länger als die bei früheren Studien in unserem Labor verwendete ab Aminosäure 257 trunkierte Version (Behrens et al., 2010). Da diese trunkierte Cx43-Variante bereits ausreichte, um eine Migrationssteigerung in HeLa-Zellen hervorzurufen, wäre es denkbar, dass auch GJA1-20k und nicht nur der C-terminale Bereich des gesamten Cx43 diesen Effekt vermittelt. Zudem wurde gezeigt, dass GJA1-20k Aktinfilamente stabilisieren kann (Basheer et al., 2017), was zur Filopodienbildung und Zellmigration beitragen könnte. Die untersuchten PKA-Phosphorylierungsstellen sind auch in der GJA1-20k Isoform enthalten und könnten somit von PKA phosphoryliert werden. (Im Western Blot konnte sowohl bei Cx43-Zellen als auch bei der Cx43-PKA-Mutante die verkürzte GJA1-20k Isoform detektiert werden.)

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von Cx43 der mit Serum stimulierten Migrationssteigerung entgegenwirkt. In vorhergehenden und in dieser Studie wurde die Zellmigration nach Stimulation mit Kälberserum untersucht. Hier ist die genaue Zusammensetzung der Inhaltsstoffe unbekannt, da verschiedene Hormone, Wachstumsfaktoren, Proteine, Lipide, Aminosäuren etc. enthalten sind. Die genauen Auslöser der migrationssteigernden Wirkung wurden hier nicht weiter untersucht. Der Epidermale Wachstumsfaktor (EGF) beispielsweise führt zur Aktivierung der GTPasen Rac1 und Cdc42 am „leading edge“ und beeinflusst somit die Aktinpolymerisierung (Kurokawa et al., 2004). Die Verwendung von artfremden Kälberserum in humanen Zelllinien könnte

außerdem zu unerwünschten Nebeneffekten/ Artefakten führen. In einer Studie wurde festgestellt, dass humanes Serum und Kälberserum das Verhalten von humanen Zellkulturen unterschiedlich beeinflussen können (Heger et al., 2018). Es müsste untersucht werden inwiefern das hier zutrifft. Durch das Serum könnten außerdem viele verschiedene Signalwege angeregt werden, die die Migration beeinflussen. Die Zellmigration wird durch ein komplexes Netzwerk aus Signalwegen reguliert, das positive und negative Feedback-Loops sowie zahlreiche Überschneidungspunkte enthält. Viele verschiedene parallele, redundante und synergetische Signalwege sind hierbei involviert und müssen koordiniert werden (Devreotes and Horwitz, 2015). Zudem sind neben chemotaktischen Stimuli, wie Wachstumsfaktoren, noch haptotaktische Migrationsstimuli, wie die Bindung von Liganden der extrazellulären Matrix oder von Integrinen vermittelte mechanische Signale bekannt (Mak et al., 2016). In einer vorangehenden Studie in unserem Labor wurde ein Signalweg für die mit Serum stimulierte migrationssteigernde Wirkung von Cx43 untersucht, bei dem PAK1, p38-MAPK und Hsp27 involviert sind. Da PKA PAK1 phosphorylieren und dadurch inhibieren kann (Howe and Juliano, 2000) und sowohl PKA, als auch PAK1 mit Cx43 interagieren können, wurde ein möglicher Einfluss von PKA auf diesen Signalweg untersucht. Bei Phosphorylierungsversuchen nach FSK-Stimulation konnten allerdings keine Auswirkungen auf PAK1, p38-MAPK oder Hsp27 beobachtet werden (Daten werden nicht gezeigt.) Möglicherweise laufen diese Signalwege parallel ab.

Die Substitution von drei AS der PKA-Phosphorylierungsstelle (Serin 364, 369 und 373) in Cx43 löste eine signifikante Steigerung der Migration im Vergleich zu Cx43 Wildtyp-Zellen aus, die allerdings mit einem Verlust der Direktionalität einherging. Es sind fünf potentielle PKA-Phosphorylierungsstellen (Serin 364, 365, 368, 369 und 373) bekannt (TenBroek et al., 2001; Yogo et al., 2006; Yogo et al., 2002), von denen die drei Serine 364, 369 und 373 ausgetauscht wurden. Die Serine 365 und 368 können sowohl von PKA als auch von PKC phosphoryliert werden und wurden daher hier nicht mutiert (Axelsen et al., 2013; Shah et al., 2002). Die Phosphorylierung von Serin 364 scheint wichtig für den PKA-induzierten Aufbau von GJs zu sein (TenBroek et al., 2001) und die Serine 369 und 373 wurden bei *in vitro* Studien mit Peptid-Arrays und Massenspektrometrie als Haupt-PKA-Phosphorylierungsstellen in Cx43 identifiziert, wodurch die GJ-Kommunikation und

Zellfusion beeinflusst werden kann (Dukic et al., 2018). Migrationsexperimente unter pharmakologischer Hemmung (PKI) bzw. Aktivierung der PKA (FSK) bestätigten die migrationshemmende Wirkung der PKA spezifisch auf Cx43-exprimierende Zellen, da bei LV-Kontrollzellen und Cx43-PKA kein Effekt beobachtet wurde. Frühere Studien zeigten, dass PKA sowohl positive als auch negative Auswirkungen auf die Migration und die damit zusammenhängende Aktinpolymerisierung haben kann (Howe, 2004). Da die intrazelluläre Regulation von cAMP und PKA je nach Zelltyp variiert und auch von der Zellumgebung, wie der extrazellulären Matrix abhängig ist, könnte dies zu den widersprüchlichen Beobachtungen führen (Howe, 2004). Beispielsweise führte die Aktivierung von PKA durch cAMP in Blasenkrebszellen (NBT-II) von Ratten zur Reduktion der Migration und damit verbundenen Zytoskelettänderungen (Morton and Tchao, 1994). Interessanterweise wird in diesen Zellen Cx43 exprimiert (Lesueur et al., 2002).. Kanal-unabhängige Effekte von Cx43 und die Zellmigration wurden in der Studie von Lesueur et al. nicht untersucht, aber es wäre durchaus denkbar, dass bei der von Morton und Tchao beobachteten, durch PKA vermittelten Reduktion der Migration Cx43 involviert war. Auch bei Brustkrebszellen (MDA-MB-231) führte die Erhöhung des cAMP-Spiegels durch FSK oder PDE-Inhibitoren zu einer verminderten Migration (Dong et al., 2015). Phosphodiesterasen bauen cAMP und cGMP zu AMP bzw. GMP ab, wodurch deren Wirkung beendet wird. PDE-Inhibitoren führen somit zu einer erhöhten Konzentration von cAMP und der Stimulierung von cAMP-Signalwegen. Bei derselben Brustkrebszelllinie wurde in einer anderen Studie Cx43 als Tumorsuppressor untersucht (Kazan et al., 2019). Cx43 ist in diesen Zellen herunterreguliert und wird nur schwach exprimiert (Kazan et al., 2019). Dennoch wäre es möglich, dass die Phosphorylierung von Cx43 durch PKA bei der durch cAMP-induzierten Hemmung der Migration von Brustkrebszellen eine Rolle spielt, vor allem, weil beobachtet wurde, dass Cx43 zu Beginn der Tumorentstehung herunterreguliert wird, später aber wieder verstärkt exprimiert wird, was mit einer erhöhten Invasivität einhergeht (Czyz, 2008). Allerdings sind auch positive Wirkungen der PKA auf die Migration beschrieben. So wird die Migration von Brustepithelzellen (MCF-10A) durch die Aktivierung von PKA stimuliert (Plopper et al., 2000). Auch diese Zellen exprimieren Cx43 (Rakib et al., 2010). PKA kann jedoch auch andere Proteine regulieren, die die Migration beeinflussen und deren Wirkung hier überwiegen könnte (Howe, 2004), vor allem

da die Migration nach Aktivierung von Integrin-Rezeptoren untersucht wurde (Plopper et al., 2000). In Fibroblasten (NIH3T3), die Cx43 exprimieren (Wei et al., 2005), bewirkte die Inhibierung von PKA eine Hemmung der Migration, jedoch hatte die Aktivierung der PKA mit FSK denselben Effekt (Edin et al., 2001). PKA scheint keinen reinen positiven oder negativen Effekt auf die Migration zu haben, sondern die balancierte Aktivierung von PKA scheint wichtig zu sein (Edin et al., 2001; Howe, 2004). Zudem wurde in den erwähnten Studien nur die Auswirkung von PKA auf die Zellmigration untersucht, jedoch nicht, ob Cx43 hierbei eine Rolle spielt. Denkbar wäre auch, dass die verschiedenen PKA-Phosphorylierungsstellen in Cx43 unterschiedliche Effekte auf die Migration ausüben können oder dass weitere Phosphorylierungsstellen, die hier nicht untersucht wurden, einen Einfluss haben.

Für die positive oder negative Wirkung von PKA auf die Migration bei unterschiedlichen Zelllinien scheint ebenso die räumliche und zeitliche Verteilung und Aktivierung der PKA eine wichtige Rolle zu spielen. Erste Hinweise für lokal begrenzte PKA-Aktivitäten bei migrierenden Zellen stammen von Howe et al., die die Anreicherung von PKA und phosphorylierten PKA-Substraten in den Lamellipodien-artigen Strukturen von Fibroblasten zeigten (Howe et al., 2005). Weitere Studien bestätigten PKA-Aktivitätsgradienten in migrierenden Zellen mit verstärkter PKA-Aktivität an der Migrationsfront (leading edge), was zur Bildung und Aufrechterhaltung von Membranausstülpungen (leading edge protrusions) und einer effizienten Migration notwendig ist (Lim et al., 2008a; Paulucci-Holthauzen et al., 2009). Auch Mo et al. beobachteten hochaktive PKA-Mikrodomänen an der Plasmamembran an der Zellfront, mit der höchsten PKA-Aktivität in Filopodien (Mo et al., 2017). Da Cx43 an der Membran und auch in Filopodien lokalisiert ist (eigene Beobachtungen und (Yamane et al., 1999)), und die Interaktion von Cx43 und PKA nach FSK-Stimulation verstärkt wurde, könnte Cx43 die Lokalisierung der PKA an der Zellfront stabilisieren und dessen notwendige Aktivität für die Bildung von Lamellipodien und Filopodien sowie der gerichteten Zellmigration verstärken.

Die Aktivierung von PKA führt zur Phosphorylierung von Effektorproteinen, wie VASP (Howe et al., 2002). VASP ist bei der Aktinpolymerisierung und Filopodienbildung involviert und spielt dadurch eine Rolle bei der Zellmigration. Deshalb ist VASP am „leading edge“ in Lamellipodien und Filopodien lokalisiert

und könnte somit ein potentieller Interaktionspartner von Cx43 sein (Gertler et al., 1996; Reinhard et al., 1992; Rottner et al., 1999).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass VASP mit Cx43 interagiert und die Stimulation mit FSK die Interaktion von Cx43 mit PKA und VASP verstärkte, während die Cx43-PKAMutante selbst unter Stimulation mit FSK nur eine schwache Bindung zu beiden Proteinen aufwies. Ebenso konnten auch andere Studien nachweisen, dass VASP in einem Komplex mit Cx43 präzipitiert bzw. mit Cx43 kolokalisiert (Benz et al., 2013; Gambaryan et al., 2001). Ob die Bindung von VASP an Cx43 direkt oder über PKA bzw. andere Proteine erfolgt, wurde nicht untersucht. Die Interaktion zwischen PKA und VASP war jedoch auch in Abwesenheit von Cx43 möglich, wie anhand von IP-Versuchen in LV-, Cx43- und Cx43-PKA-Zellen gezeigt werden konnte. Allerdings konnte beobachtet werden, dass die Bindung von PKA und VASP an Cx43 nach FSK-Stimulation mit einer verstärkten VASP-Phosphorylierung an Serin 157 einherging. Hierbei war im Vergleich zu LV- oder Cx43-PKA-Zellen die VASP-Phosphorylierung nach PKA-Aktivierung nur in Cx43-exprimierenden Zellen signifikant erhöht. Umgekehrt führte die Zugabe des PKA-Inhibitors PKI in Cx43 Zellen zur Reduktion der VASP-Phosphorylierung an Serin 157. Serin 157 ist die bevorzugte PKA-Phosphorylierungsstelle in VASP und scheint als Signal für dessen Lokalisierung an der Membran- oder Migrationsfront zu dienen (Benz et al., 2009; Butt et al., 1994; Döppler et al., 2013; Smolenski et al., 1998). Einige Studien berichten, dass die PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP dessen fördernde Wirkung auf die Aktinpolymerisierung aufhebt, da seine Anti-Capping-Funktion dadurch inhibiert wird (Barzik et al., 2005). Die Bindung von VASP an G-Aktin und F-Aktin, sowie seine Aktinnukleationskapazität wird somit gemindert (Harbeck et al., 2000; Walders-Harbeck et al., 2002). Dies sollte sich in der Filopodienbildung widerspiegeln. Tatsächlich konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Stimulation mit FSK zu einer signifikanten Reduktion der Filopodienanzahl bei Cx43-exprimierenden Zellen führte. Chen et al. beobachteten ebenfalls, dass in embryonalen Mausfibroblasten (MEF) sowie in Brustkrebszellen die Stimulation mit cAMP zu einer verstärkten VASP-Phosphorylierung und einer verminderten Zellmigration und Lamellipodienbildung führte (Chen et al., 2008). Auch Benz et al. beobachteten, dass die Phosphorylierung von VASP zur Reduktion der Aktinpolymerisierung führte. Dies war aber hauptsächlich auf die Phosphorylierung

von Serin 239 (überwiegend von PKG phosphoryliert) und Threonin 278 (überwiegend von AMPK phosphoryliert) zurückzuführen. Die Phosphorylierung von Serin 157, welche in der vorliegenden Arbeit untersucht wurde, hatte dagegen nur einen geringen Effekt auf die F-Aktinpolymerisierung, aber bewirkte eine Änderung der VASP-Lokalisierung an die Plasmamembran in Lamellipodien und fokalen Adhäsionen (Benz et al., 2009). Benz et al. untersuchten die Aktinpolymerisierung mit einem *in vitro*-Assay, der auf einer gesteigerten Pyren-Fluoreszenz, abhängig von der F-Aktin-Konzentration, basiert. Hierzu verwendeten sie aufgereinigtes Wildtyp-VASP und verschiedene phosphomimetische VASP-Mutanten, die in *E. coli* exprimiert wurden. (Benz et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde die Aktinpolymerisierung dagegen anhand der Filopodienbildung von migrierenden HeLa-Zellen und der endogenem VASP untersucht. Vermutlich lässt sich der mangelnde Effekt der S157-Phosphorylierung bei den *in vitro*-Versuchen auf fehlende zelluläre Regulationsmechanismen und Interaktionspartner, die bei der Aktinpolymerisierung eine Rolle spielen, zurückführen. Weitere Hinweise auf die negative Auswirkung der VASP-Phosphorylierung an S157 auf die Filopodienbildung lieferte eine Studie mit dem Schleimpilz Dictyostelium, welcher VASP als einziges Ena/VASP Protein exprimiert und berichtete, dass der Knockout von VASP zu einer Mutante führte, die keine Filopodien bilden konnte (Han et al., 2002). Lin et al. untersuchten den Einfluss der Phosphorylierung von VASP an Serin 141, welches dem Serin 157 in Mammalia entspricht. Eine phosphomimetische VASP-Mutante, die eine Phosphorylierung an Serin 141 simulierte, konnte die Filopodienbildung der VASP-Knockout-Zellen nur teilweise wiederherstellen, woraus sie auf einen negativen Effekt dieser Phosphorylierung auf die Filopodienformation schlossen. Zellen mit einer nicht phosphorylierbaren VASP-Mutante zeigte dagegen eine schnellere Bewegung mit geringer Direktionalität und die Zellen wiesen eine weniger polarisierte Morphologie auf (Lin et al., 2010), ähnlich zu den Befunden der Cx43-PKA-Mutante, die auch nach FSK-Stimulation eine deutlich geringere VASP-Phosphorylierung (S157) aufwies. Lin et al. folgerten, dass die Phosphorylierung von VASP für die Unterdrückung von Lamellipodien und Filopodien an den Seiten und hinterem Teil der Zelle von Bedeutung ist und somit für die Ausbildung von Zellpolarität, um eine effiziente Chemotaxis bei einem cAMP-Gradienten zu erzielen (Lin et al., 2010). Der Schleimpilz Dictyostelium exprimiert allerdings

keine Connexine (Kaufmann et al., 2012), weshalb die zelluläre Lokalisation und Regulation von VASP und PKA vermutlich anders reguliert wird. Die Cx43-PKA-Mutante wies aber ebenfalls eine beschleunigte und richtungslose Migration, verbunden mit einer verminderten VASP-Phosphorylierung auf. Somit könnte die PKA-Phosphorylierungsstelle in Cx43 über die Interaktion von Cx43 mit PKA und VASP und dessen anschließende Phosphorylierung durch PKA für die Regulation der Migration von Bedeutung sein. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Aktivierung von PKA auch andere Signalwege aktiviert oder inhibiert werden, die ebenfalls zur Migration beitragen. Der Effekt von PKA könnte auch indirekt über die Inhibierung von Phosphatasen erfolgen. Beispielsweise könnte PKA eine Phosphatase hemmen, die normalerweise VASP dephosphoryliert, was ebenfalls zu einer verstärkten VASP-Phosphorylierung führen würde.

Da IRSp53 als Adapter- und Gerüstprotein Membranausstülpungen und Aktinzytoskelettdynamik miteinander verknüpft und somit an der Filopodienbildung beteiligt ist, stellt es eine mögliche Verbindung zwischen dem Transmembranprotein Cx43 und dem an der Aktinpolymerisierung beteiligten Protein VASP dar, welches von IRSp53 rekrutiert wird (Disanza et al., 2013). In dieser Arbeit konnte eine Interaktion von IRSp53 und Cx43 in Cx43-Wildtyp Zellen gezeigt werden. Die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstelle hatte eine signifikant reduzierte Interaktion mit IRSp53 zur Folge. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Interaktion von VASP mit IRSp53 in Cx43-exprimierenden Zellen im Vergleich zu LV- und Cx43-PKA-Zellen signifikant erhöht war. Daraus kann geschlossen werden, dass Cx43, VASP und IRSp53 einen Komplex bilden und Cx43 die Interaktion zwischen VASP und IRSp53 verstärkt. Möglicherweise wird die Bindung von VASP an Cx43 von IRSp53 vermittelt. Die PKA-Phosphorylierungsstelle in Cx43 scheint für die Bindung dieser Interaktionspartner entscheidend zu sein. Die genauen Bindungsstellen wurden in dieser Arbeit nicht ermittelt. Zukünftigen Studien mit trunkierten Cx43-Proteinen bzw. Peptiden könnten die Bindungsstellen in Cx43 analysieren. Die Protein-Protein-Interaktionen wurden mit IP-Studien ermittelt, bei denen ein Gemisch aus Proteinen, die miteinander interagieren, gefällt werden. Deshalb konnten keine Rückschlüsse gezogen werden, ob die jeweilige Interaktion mit Cx43 direkt oder indirekt über andere Proteine in diesem Komplex stattfindet. Um das

herauszufinden, könnten die isolierten Proteine mit der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) untereinander auf Interaktion untersucht werden. Zudem könnten noch weitere Proteine Teil dieses Signalkomplexes sein und zur gerichteten Migration beitragen, was durch IP-Studien in Kombination mit Massenspektrometrie untersucht werden könnte. Pidoux et al. zeigten, dass die Bindung von PKA an Cx43 nicht direkt stattfindet, sondern von Ezrin vermittelt wird. Es wäre möglich, dass Ezrin auch Teil des hier beobachteten Signalkomplexes ist. Pidoux et al. Ermittelten zudem eine minimale Bindestelle für Ezrin im C-Terminus von Cx43 von AS 366 bis AS 370 (RASSR) (Pidoux et al., 2014). Innerhalb dieser Bindestelle liegt auch ein in der vorliegenden Arbeit untersuchtes Serin. Hier wurde gezeigt, dass die mutierten Serine in der PKA-Phosphorylierungsstelle von Cx43 wichtig für die Bildung des Signalkomplexes aus Cx43, PKA, VASP und IRSp53 sind. Ob dabei alle drei untersuchten Serine oder nur ein oder zwei von PKA phosphoryliert werden, könnte mit Massenspektrometrie analysiert werden und so weitere Details über den Signalweg liefern.

PKA könnte nach Aktivierung verstärkt an diesen Cx43-Komplex binden und VASP phosphorylieren. Dies führt zur Drosselung der Filopodienbildung und trägt somit zu einer kontrollierten und gerichteten Migration bei. Durch Mutation der PKA-Phosphorylierungsstelle wird die Bildung eines solchen Komplexes gestört, was die schnelle und unkontrollierte Migration der Cx43-PKA-Zellen erklärt.

Pathophysiologische Prozesse, wie Atherosklerose oder Metastasenbildung, sind mit einer erhöhten unkontrollierten Migration verknüpft. Da mehr als 90 % der Patienten mit soliden Tumoren an den Auswirkungen von Metastasen sterben, ist es wichtig, die molekularen Mechanismen der Metastasenbildung aufzuklären, um Medikamente dagegen entwickeln zu können (Gupta and Massague, 2006). Zudem ist bekannt, dass Cx43 bei einigen Krebsarten bei der Metastasierung involviert ist (Bates et al., 2007; Lamiche et al., 2012). Die vorliegende Arbeit könnte dazu beitragen, einen Teil der zugrundeliegenden Mechanismen aufzuklären. Substanzen, die den cAMP-Spiegel erhöhen und damit PKA aktivieren (Aktivatoren der Adenylzyklase, PDE-Inhibitoren, Membran-permeable cAMP-Analoga) könnten eingesetzt werden, um die migrationssteigernde Wirkung von Cx43 zu reduzieren. Bauchspeicheldrüsenkrebszellen (duktales Adenokarzinom), in denen Cx43 hochreguliert ist, weisen eine hohe Invasivität auf

(Solan et al., 2012). Es wurde gezeigt, dass cAMP durch die Aktivierung von PKA die Migration dieser Zellen inhibiert und somit die Metastasierung hemmt (Burdyga et al., 2013). Auch bei Brustkrebszellen, die Cx43 exprimieren, konnte die Migration durch cAMP inhibiert werden (Dong et al., 2015; Kazan et al., 2019). Die Autoren schlagen deshalb vor, dass PDE-Hemmer als Mittel gegen Metastasenbildung bei Brustkrebs eingesetzt werden könnten (Dong et al., 2015). Da Cx43 durch seine migrationssteigernde Wirkung bei der Metastasierung einiger Krebsarten involviert ist, könnte Cx43 bei diesen Tumoren hinsichtlich Mutationen der Serine der PKA-Phosphorylierungsstellen untersucht werden. Es könnte überprüft werden, ob der untersuchte Signalweg eine Rolle bei der Migration dieser Tumorzellen spielt, um dies für therapeutische Zwecke zu nutzen. Zudem wäre es interessant, wie Cx43 als Modulator der Zellmigration reguliert wird. In dieser Studie wurde nur zwischen der Ab- (LV-Zellen) und Anwesenheit von Cx43 (Cx43-Zellen) unterschieden, jedoch nicht, ob viel oder wenig Cx43 exprimiert wurde. Bei vielen Tumorarten wird die Expression von Cx43 anfangs herunterreguliert und in späteren Stadien verstärkt hochreguliert, was zu einer erhöhten Invasivität und Metastasierung führt (Naus and Laird, 2010). Bei der Metastasierung von Brustkrebs und Melanomen wird die Expression von Cx43 beispielsweise durch den Transkriptionsfaktor twist reguliert (Stoletov et al., 2013). Cx43 besitzt ein cAMP-Responsive-Element (CREB) in der Promotorregion, wodurch cAMP zur vermehrten Expression von Cx43 beitragen könnte (Oyamada et al., 2005). Es ist auch unklar, ob Cx43 für seine Effekte auf die Migration aktiviert werden muss. Die PKA-abhängige Phosphorylierung führt z.B. zum verstärkten Einbau von Cx43 in die Membran und erhöht die Permeabilität (Burghardt et al., 1995; Paulson et al., 2000; Shah et al., 2002). Allerdings könnte auch die verkürzte Version GJA1-20k die Effekte auf die Migration auslösen. GJA1-20k kann unabhängig von Cx43 reguliert werden, scheint aber wichtig für den Transport von Cx43 an die Membran, durch Reorganisation des Zytoskeletts, zu sein (Basheer et al., 2017; Smyth and Shaw, 2013). In der vorliegenden Studie wurde zudem selektiv der Einfluss von Cx43 auf die Migration untersucht, aber in anderen Zellen könnten auch weitere Connexine zur Regulation beitragen.

V Zusammenfassung

Frühere Studien in unserem Labor haben gezeigt, dass die migrationssteigernde Wirkung durch den C-terminalen Bereich von Cx43 vermittelt wird und unabhängig von der Ausbildung funktioneller GJ-Kanäle („Kanal-unabhängig“) ist (Behrens et al., 2010). Hierbei spielt vor allem der C-terminale Bereich von Connexinen für deren Kanal-unabhängige Funktionen eine wichtige Rolle. Der C-Terminus von Cx43 enthält zahlreiche Protein-Interaktionsstellen und kann von verschiedenen Kinasen modifiziert werden (Giepmans, 2004; Solan and Lampe, 2009). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob und wie bekannte Protein-Interaktionsstellen (SH2- und SH3-Bindedomänen) bzw. einige der PKA-Phosphorylierungsstellen in Cx43 dabei eine Rolle spielen, indem Mutationen untersucht wurden, die eine entsprechende Bindung oder Phosphorylierung verhindern.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Mutation der SH2- und SH3-Bindedomänen von Cx43 die Zellmigration verringert wurde, vergleichbar zu Cx-defizienten Kontrollzellen (LV). Dagegen steigerte die Mutation der PKA-Phosphorylierungsstellen die Migration zusätzlich, was aber mit einer verminderten Direktionalität einherging. Das heißt, die PKA-abhängige Phosphorylierung von Cx43 scheint die Migration eher zu limitieren. Dass PKA hier tatsächlich entsprechend involviert ist und Cx43 eine spezifische Rolle spielt, konnte durch Experimente mit pharmakologischer PKA-Aktivierung (FSK) bzw. Inhibierung (PKI) bestätigt werden: Die Aktivierung von PKA führte zur Reduktion, wohingegen die Inhibierung von PKA zur Steigerung der Migration von Cx43-exprimierenden Zellen führte, aber keinen Effekt auf die Cx43-PKA Mutante und LV-Zellen hatte. Zudem zeigte sich nach PKA-Stimulation durch FSK eine ausgeprägte Protein-Protein-Interaktion von PKA mit Cx43, während die Cx43-PKA-Mutante nur eine schwache Interaktion mit PKA, auch unter Stimulation mit FSK, aufwies. Auch das PKA-Effektorprotein VASP konnte als Interaktionspartner von Cx43 identifiziert werden und zeigte in gleicher Weise wie PKA eine verstärkte Interaktion (direkt oder indirekt) mit Cx43 unter FSK-Stimulation. Zudem war die PKA-abhängige Phosphorylierung von VASP an Serin 157 nach Stimulation mit FSK in Cx43-exprimierenden Zellen im Vergleich zu Kontrollzellen und der Cx43-PKA-Mutante erhöht und ging mit einer reduzierten Filopodienbildung in Cx43-exprimierenden Zellen einher. Außerdem konnte nachgewiesen werden, dass

Cx43 auch mit dem Adapterprotein IRSp53 interagieren kann und sich somit in einem Signalkomplex mit Cx43, PKA und VASP befindet. Da die Cx43-PKA-Mutante nur eine schwache Interaktion mit den untersuchten Proteinen zeigte, scheinen die PKA-Phosphorylierungsstellen hierfür von Bedeutung zu sein. Die PKA-abhängige Phosphorylierung von Cx43 scheint somit die Regulation der Filopodienbildung und die gerichtete Zellmigration zu beeinflussen.

VI Literaturverzeichnis

Ahmed, S., Goh, W.I., and Bu, W. (2010). I-BAR domains, IRSp53 and filopodium formation. *Semin Cell Dev Biol* 21, 350-356.

Ambrosi, C., Ren, C., Spagnol, G., Cavin, G., Cone, A., Grintsevich, E.E., Sosinsky, G.E., and Sorgen, P.L. (2016). Connexin43 Forms Supramolecular Complexes through Non-Overlapping Binding Sites for Drebrin, Tubulin, and ZO-1. *PLoS One* 11, e0157073.

Atkinson, M.M., and Sheridan, J.D. (1988). Altered junctional permeability between cells transformed by v-ras, v-mos, or v-src. *Am J Physiol* 255, C674-683.

Axelsen, L.N., Calloe, K., Holstein-Rathlou, N.H., and Nielsen, M.S. (2013). Managing the complexity of communication: regulation of gap junctions by post-translational modification. *Front Pharmacol* 4, 130.

Bachmann, C., Fischer, L., Walter, U., and Reinhard, M. (1999). The EVH2 domain of the vasodilator-stimulated phosphoprotein mediates tetramerization, F-actin binding, and actin bundle formation. *J Biol Chem* 274, 23549-23557.

Bachmann, V.A., Bister, K., and Stefan, E. (2013). Interplay of PKA and Rac: fine-tuning of Rac localization and signaling. *Small GTPases* 4, 247-251.

Ball, L.J., Kuhne, R., Hoffmann, B., Hafner, A., Schmieder, P., Volkmer-Engert, R., Hof, M., Wahl, M., Schneider-Mergener, J., Walter, U., *et al.* (2000). Dual epitope recognition by the VASP EVH1 domain modulates polyproline ligand specificity and binding affinity. *EMBO J* 19, 4903-4914.

Barzik, M., Kotova, T.I., Higgs, H.N., Hazelwood, L., Hanein, D., Gertler, F.B., and Schafer, D.A. (2005). Ena/VASP proteins enhance actin polymerization in the presence of barbed end capping proteins. *J Biol Chem* 280, 28653-28662.

Basheer, W.A., Xiao, S., Epifantseva, I., Fu, Y., Kleber, A.G., Hong, T., and Shaw, R.M. (2017). GJA1-20k Arranges Actin to Guide Cx43 Delivery to Cardiac Intercalated Discs. *Circ Res* 121, 1069-1080.

Bates, D.C., Sin, W.C., Aftab, Q., and Naus, C.C. (2007). Connexin43 enhances glioma invasion by a mechanism involving the carboxy terminus. *Glia* 55, 1554-1564.

Batra, N., Burra, S., Siller-Jackson, A.J., Gu, S., Xia, X., Weber, G.F., DeSimone, D., Bonewald, L.F., Lafer, E.M., Sprague, E., *et al.* (2012). Mechanical stress-activated integrin $\alpha 5 \beta 1$ induces opening of connexin 43 hemichannels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 3359-3364.

Beahm, D.L., Oshima, A., Gaietta, G.M., Hand, G.M., Smock, A.E., Zucker, S.N., Toloue, M.M., Chandrasekhar, A., Nicholson, B.J., and Sosinsky, G.E. (2006). Mutation of a conserved threonine in the third transmembrane helix of α - and β -connexins creates a dominant-negative closed gap junction channel. *J Biol Chem* 281, 7994-8009.

Bear, J.E., Svitkina, T.M., Krause, M., Schafer, D.A., Loureiro, J.J., Strasser, G.A., Maly, I.V., Chaga, O.Y., Cooper, J.A., Borisy, G.G., *et al.* (2002). Antagonism between Ena/VASP proteins and actin filament capping regulates fibroblast motility. *Cell* 109, 509-521.

- Beardslee, M.A., Laing, J.G., Beyer, E.C., and Saffitz, J.E. (1998). Rapid turnover of connexin43 in the adult rat heart. *Circ Res* 83, 629-635.
- Behrens, J., Kameritsch, P., Wallner, S., Pohl, U., and Pogoda, K. (2010). The carboxyl tail of Cx43 augments p38 mediated cell migration in a gap junction-independent manner. *Eur J Cell Biol* 89, 828-838.
- Benz, P.M., Blume, C., Seifert, S., Wilhelm, S., Waschke, J., Schuh, K., Gertler, F., Munzel, T., and Renne, T. (2009). Differential VASP phosphorylation controls remodeling of the actin cytoskeleton. *Journal of cell science* 122, 3954-3965.
- Benz, P.M., Merkel, C.J., Offner, K., Abesser, M., Ullrich, M., Fischer, T., Bayer, B., Wagner, H., Gambaryan, S., Ursitti, J.A., *et al.* (2013). Mena/VASP and alphaII-Spectrin complexes regulate cytoplasmic actin networks in cardiomyocytes and protect from conduction abnormalities and dilated cardiomyopathy. *Cell Commun Signal* 11, 56.
- Beyer, E.C., Goodenough, D.A. and Paul, D.L. (1988). The connexins, a family of related gap junction proteins. *Gap Junctions* New York, Springer Verlag.
- Bryce, N.S., Clark, E.S., Leysath, J.L., Currie, J.D., Webb, D.J., and Weaver, A.M. (2005). Cortactin promotes cell motility by enhancing lamellipodial persistence. *Curr Biol* 15, 1276-1285.
- Burdyga, A., Conant, A., Haynes, L., Zhang, J., Jalink, K., Sutton, R., Neoptolemos, J., Costello, E., and Tepikin, A. (2013). cAMP inhibits migration, ruffling and paxillin accumulation in focal adhesions of pancreatic ductal adenocarcinoma cells: effects of PKA and EPAC. *Biochimica et biophysica acta* 1833, 2664-2672.
- Burghardt, R.C., Barhoumi, R., Sewall, T.C., and Bowen, J.A. (1995). Cyclic AMP induces rapid increases in gap junction permeability and changes in the cellular distribution of connexin43. *J Membr Biol* 148, 243-253.
- Butkevich, E., Hulsmann, S., Wenzel, D., Shirao, T., Duden, R., and Majoul, I. (2004). Drebrin is a novel connexin-43 binding partner that links gap junctions to the submembrane cytoskeleton. *Curr Biol* 14, 650-658.
- Butt, E., Abel, K., Krieger, M., Palm, D., Hoppe, V., Hoppe, J., and Walter, U. (1994). cAMP- and cGMP-dependent protein kinase phosphorylation sites of the focal adhesion vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) in vitro and in intact human platelets. *J Biol Chem* 269, 14509-14517.
- Campanale, J.P., Sun, T.Y., and Montell, D.J. (2017). Development and dynamics of cell polarity at a glance. *Journal of cell science* 130, 1201-1207.
- Caspar, D.L., Goodenough, D.A., Makowski, L., and Phillips, W.C. (1977). Gap junction structures. I. Correlated electron microscopy and x-ray diffraction. *The Journal of cell biology* 74, 605-628.
- Chen, L., Zhang, J.J., and Huang, X.Y. (2008). cAMP inhibits cell migration by interfering with Rac-induced lamellipodium formation. *J Biol Chem* 283, 13799-13805.
- Chen, S.C., Pelletier, D.B., Ao, P., and Boynton, A.L. (1995). Connexin43 reverses the phenotype of transformed cells and alters their expression of cyclin/cyclin-dependent kinases. *Cell Growth Differ* 6, 681-690.

- Chepied, A., Daoud-Omar, Z., Meunier-Balandre, A.C., Laird, D.W., Mesnil, M., and Defamie, N. (2020). Involvement of the Gap Junction Protein, Connexin43, in the Formation and Function of Invadopodia in the Human U251 Glioblastoma Cell Line. *Cells* **9**.
- Cooper, C.D., and Lampe, P.D. (2002). Casein kinase 1 regulates connexin-43 gap junction assembly. *J Biol Chem* **277**, 44962-44968.
- Crespin, S., Bechberger, J., Mesnil, M., Naus, C.C., and Sin, W.C. (2010). The carboxy-terminal tail of connexin43 gap junction protein is sufficient to mediate cytoskeleton changes in human glioma cells. *J Cell Biochem* **110**, 589-597.
- Czyz, J. (2008). The stage-specific function of gap junctions during tumourigenesis. *Cell Mol Biol Lett* **13**, 92-102.
- Davis, D.M., and Sowinski, S. (2008). Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**, 431-436.
- de Wit, C., Roos, F., Bolz, S.S., Kirchhoff, S., Kruger, O., Willecke, K., and Pohl, U. (2000). Impaired conduction of vasodilation along arterioles in connexin40-deficient mice. *Circ Res* **86**, 649-655.
- Devreotes, P., and Horwitz, A.R. (2015). Signaling networks that regulate cell migration. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **7**, a005959.
- Disanza, A., Bisi, S., Winterhoff, M., Milanese, F., Ushakov, D.S., Kast, D., Marighetti, P., Romet-Lemonne, G., Muller, H.M., Nickel, W., *et al.* (2013). CDC42 switches IRSp53 from inhibition of actin growth to elongation by clustering of VASP. *EMBO J* **32**, 2735-2750.
- Dong, H., Claffey, K.P., Brocke, S., and Epstein, P.M. (2015). Inhibition of breast cancer cell migration by activation of cAMP signaling. *Breast Cancer Res Treat* **152**, 17-28.
- Döppler, H., and Storz, P. (2013). Regulation of VASP by phosphorylation: consequences for cell migration. *Cell Adh Migr* **7**, 482-486.
- Döppler, H.R., Bastea, L.I., Lewis-Tuffin, L.J., Anastasiadis, P.Z., and Storz, P. (2013). Protein kinase D1-mediated phosphorylations regulate vasodilator-stimulated phosphoprotein (VASP) localization and cell migration. *J Biol Chem* **288**, 24382-24393.
- Drees, B., Friederich, E., Fradelizi, J., Louvard, D., Beckerle, M.C., and Golsteyn, R.M. (2000). Characterization of the interaction between zyxin and members of the Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein family of proteins. *J Biol Chem* **275**, 22503-22511.
- Duffy, H.S., Ashton, A.W., O'Donnell, P., Coombs, W., Taffet, S.M., Delmar, M., and Spray, D.C. (2004). Regulation of connexin43 protein complexes by intracellular acidification. *Circ Res* **94**, 215-222.
- Dukic, A.R., Gerbaud, P., Guibourdenche, J., Thiede, B., Tasken, K., and Pidoux, G. (2018). Ezrin-anchored PKA phosphorylates serine 369 and 373 on connexin 43 to enhance gap junction assembly, communication, and cell fusion. *Biochem J* **475**, 455-476.
- Dummler, B., Ohshiro, K., Kumar, R., and Field, J. (2009). Pak protein kinases and their role in cancer. *Cancer Metastasis Rev* **28**, 51-63.

- Edin, M.L., Howe, A.K., and Juliano, R.L. (2001). Inhibition of PKA blocks fibroblast migration in response to growth factors. *Experimental cell research* 270, 214-222.
- Elfgang, C., Eckert, R., Lichtenberg-Frate, H., Butterweck, A., Traub, O., Klein, R.A., Hulser, D.F., and Willecke, K. (1995). Specific permeability and selective formation of gap junction channels in connexin-transfected HeLa cells. *The Journal of cell biology* 129, 805-817.
- Elias, L.A., Wang, D.D., and Kriegstein, A.R. (2007). Gap junction adhesion is necessary for radial migration in the neocortex. *Nature* 448, 901-907.
- Ellerbroek, S.M., Wennerberg, K., and Burridge, K. (2003). Serine phosphorylation negatively regulates RhoA in vivo. *J Biol Chem* 278, 19023-19031.
- Etienne-Manneville, S. (2004). Cdc42--the centre of polarity. *Journal of cell science* 117, 1291-1300.
- Evans, W.H., and Martin, P.E. (2002). Lighting up gap junction channels in a flash. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 24, 876-880.
- Falk, M.M. (2000). Connexin-specific distribution within gap junctions revealed in living cells. *Journal of cell science* 113 (Pt 22), 4109-4120.
- Feoktistov, I., Goldstein, A.E., and Biaggioni, I. (2000). Cyclic AMP and protein kinase A stimulate Cdc42: role of A(2) adenosine receptors in human mast cells. *Mol Pharmacol* 58, 903-910.
- Ferron, F., Rebowski, G., Lee, S.H., and Dominguez, R. (2007). Structural basis for the recruitment of profilin-actin complexes during filament elongation by Ena/VASP. *EMBO J* 26, 4597-4606.
- Fincham, V.J., and Frame, M.C. (1998). The catalytic activity of Src is dispensable for translocation to focal adhesions but controls the turnover of these structures during cell motility. *EMBO J* 17, 81-92.
- Fontes, M.S., van Veen, T.A., de Bakker, J.M., and van Rijen, H.V. (2012). Functional consequences of abnormal Cx43 expression in the heart. *Biochimica et biophysica acta* 1818, 2020-2029.
- Frame, M.C., Fincham, V.J., Carragher, N.O., and Wyke, J.A. (2002). v-Src's hold over actin and cell adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3, 233-245.
- Francis, R., Xu, X., Park, H., Wei, C.J., Chang, S., Chatterjee, B., and Lo, C. (2011). Connexin43 modulates cell polarity and directional cell migration by regulating microtubule dynamics. *PLoS One* 6, e26379.
- Friedl, P., and Gilmour, D. (2009). Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 445-457.
- Fu, C.T., Bechberger, J.F., Ozog, M.A., Perbal, B., and Naus, C.C. (2004). CCN3 (NOV) interacts with connexin43 in C6 glioma cells: possible mechanism of connexin-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 279, 36943-36950.

- Fujimoto, K., Nagafuchi, A., Tsukita, S., Kuraoka, A., Ohokuma, A., and Shibata, Y. (1997). Dynamics of connexins, E-cadherin and alpha-catenin on cell membranes during gap junction formation. *Journal of cell science* 110 (Pt 3), 311-322.
- Gaietta, G., Deerinck, T.J., Adams, S.R., Bouwer, J., Tour, O., Laird, D.W., Sosinsky, G.E., Tsien, R.Y., and Ellisman, M.H. (2002). Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science* 296, 503-507.
- Gambaryan, S., Hauser, W., Kobsar, A., Glazova, M., and Walter, U. (2001). Distribution, cellular localization, and postnatal development of VASP and Mena expression in mouse tissues. *Histochem Cell Biol* 116, 535-543.
- Geletu, M., Trotman-Grant, A., and Raptis, L. (2012). Mind the gap; regulation of gap junctional, intercellular communication by the SRC oncogene product and its effectors. *Anticancer Res* 32, 4245-4250.
- Gertler, F.B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.
- Giepmans, B.N. (2004). Gap junctions and connexin-interacting proteins. *Cardiovasc Res* 62, 233-245.
- Giepmans, B.N., Hengeveld, T., Postma, F.R., and Moolenaar, W.H. (2001a). Interaction of c-Src with gap junction protein connexin-43. Role in the regulation of cell-cell communication. *J Biol Chem* 276, 8544-8549.
- Giepmans, B.N., Verlaan, I., Hengeveld, T., Janssen, H., Calafat, J., Falk, M.M., and Moolenaar, W.H. (2001b). Gap junction protein connexin-43 interacts directly with microtubules. *Curr Biol* 11, 1364-1368.
- Govind, S., Kozma, R., Monfries, C., Lim, L., and Ahmed, S. (2001). Cdc42Hs facilitates cytoskeletal reorganization and neurite outgrowth by localizing the 58-kD insulin receptor substrate to filamentous actin. *The Journal of cell biology* 152, 579-594.
- Graeber, S.H., and Hulser, D.F. (1998). Connexin transfection induces invasive properties in HeLa cells. *Experimental cell research* 243, 142-149.
- Gu, S., Yu, X.S., Yin, X., and Jiang, J.X. (2003). Stimulation of lens cell differentiation by gap junction protein connexin 45.6. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 2103-2111.
- Gupta, G.P., and Massague, J. (2006). Cancer metastasis: building a framework. *Cell* 127, 679-695.
- Gupton, S.L., and Gertler, F.B. (2007). Filopodia: the fingers that do the walking. *Sci STKE* 2007, re5.
- Hall, C.L., Lange, L.A., Prober, D.A., Zhang, S., and Turley, E.A. (1996). pp60(c-src) is required for cell locomotion regulated by the hyaluronanreceptor RHAMM. *Oncogene* 13, 2213-2224.
- Han, Y.H., Chung, C.Y., Wessels, D., Stephens, S., Titus, M.A., Soll, D.R., and Firtel, R.A. (2002). Requirement of a vasodilator-stimulated phosphoprotein family member for cell adhesion, the formation of filopodia, and chemotaxis in dictyostelium. *J Biol Chem* 277, 49877-49887.

- Harbeck, B., Huttelmaier, S., Schluter, K., Jockusch, B.M., and Illenberger, S. (2000). Phosphorylation of the vasodilator-stimulated phosphoprotein regulates its interaction with actin. *J Biol Chem* 275, 30817-30825.
- He, Y., Ren, Y., Wu, B., Decourt, B., Lee, A.C., Taylor, A., and Suter, D.M. (2015). Src and cortactin promote lamellipodia protrusion and filopodia formation and stability in growth cones. *Molecular biology of the cell* 26, 3229-3244.
- Heger, J.I., Froehlich, K., Pastushek, J., Schmidt, A., Baer, C., Mrowka, R., Backsch, C., Schleussner, E., Markert, U.R., and Schmidt, A. (2018). Human serum alters cell culture behavior and improves spheroid formation in comparison to fetal bovine serum. *Experimental cell research* 365, 57-65.
- Herve, J.C., and Sarrouilhe, D. (2006). Protein phosphatase modulation of the intercellular junctional communication: importance in cardiac myocytes. *Prog Biophys Mol Biol* 90, 225-248.
- Hotulainen, P., and Lappalainen, P. (2006). Stress fibers are generated by two distinct actin assembly mechanisms in motile cells. *The Journal of cell biology* 173, 383-394.
- Howe, A.K. (2004). Regulation of actin-based cell migration by cAMP/PKA. *Biochimica et biophysica acta* 1692, 159-174.
- Howe, A.K., Baldor, L.C., and Hogan, B.P. (2005). Spatial regulation of the cAMP-dependent protein kinase during chemotactic cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 14320-14325.
- Howe, A.K., Hogan, B.P., and Juliano, R.L. (2002). Regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein phosphorylation and interaction with Abl by protein kinase A and cell adhesion. *J Biol Chem* 277, 38121-38126.
- Howe, A.K., and Juliano, R.L. (2000). Regulation of anchorage-dependent signal transduction by protein kinase A and p21-activated kinase. *Nat Cell Biol* 2, 593-600.
- Huang, C., Ni, Y., Wang, T., Gao, Y., Haudenschield, C.C., and Zhan, X. (1997). Down-regulation of the filamentous actin cross-linking activity of cortactin by Src-mediated tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem* 272, 13911-13915.
- Huang, G.Y., Cooper, E.S., Waldo, K., Kirby, M.L., Gilula, N.B., and Lo, C.W. (1998). Gap junction-mediated cell-cell communication modulates mouse neural crest migration. *The Journal of cell biology* 143, 1725-1734.
- Huveneers, S., and Danen, E.H. (2009). Adhesion signaling - crosstalk between integrins, Src and Rho. *Journal of cell science* 122, 1059-1069.
- Ilic, D., Furuta, Y., Kanazawa, S., Takeda, N., Sobue, K., Nakatsuji, N., Nomura, S., Fujimoto, J., Okada, M., and Yamamoto, T. (1995). Reduced cell motility and enhanced focal adhesion contact formation in cells from FAK-deficient mice. *Nature* 377, 539-544.
- Jacquemet, G., Hamidi, H., and Ivaska, J. (2015). Filopodia in cell adhesion, 3D migration and cancer cell invasion. *Curr Opin Cell Biol* 36, 23-31.
- John, S.A., and Revel, J.P. (1991). Connexon integrity is maintained by non-covalent bonds: intramolecular disulfide bonds link the extracellular domains in rat connexin-43. *Biochem Biophys Res Commun* 178, 1312-1318.

Johnson, R.G., Meyer, R.A., Li, X.R., Preus, D.M., Tan, L., Grunenwald, H., Paulson, A.F., Laird, D.W., and Sheridan, J.D. (2002). Gap junctions assemble in the presence of cytoskeletal inhibitors, but enhanced assembly requires microtubules. *Experimental cell research* 275, 67-80.

Johnstone, S.R., Kroncke, B.M., Straub, A.C., Best, A.K., Dunn, C.A., Mitchell, L.A., Peskova, Y., Nakamoto, R.K., Koval, M., Lo, C.W., *et al.* (2012). MAPK phosphorylation of connexin 43 promotes binding of cyclin E and smooth muscle cell proliferation. *Circ Res* 111, 201-211.

Jordan, K., Chodock, R., Hand, A.R., and Laird, D.W. (2001). The origin of annular junctions: a mechanism of gap junction internalization. *Journal of cell science* 114, 763-773.

Joshi-Mukherjee, R., Coombs, W., Burrer, C., de Mora, I.A., Delmar, M., and Taffet, S.M. (2007). Evidence for the presence of a free C-terminal fragment of cx43 in cultured cells. *Cell communication & adhesion* 14, 75-84.

Kameritsch, P., Kiemer, F., Beck, H., Pohl, U., and Pogoda, K. (2015). Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. *Biochimica et biophysica acta* 1853, 2907-2917.

Kameritsch, P., Kiemer, F., Mannell, H., Beck, H., Pohl, U., and Pogoda, K. (2019). PKA negatively modulates the migration enhancing effect of Connexin 43. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1866, 828-838.

Kameritsch, P., Pogoda, K., and Pohl, U. (2012). Channel-independent influence of connexin 43 on cell migration. *Biochimica et biophysica acta* 1818, 1993-2001.

Kast, D.J., Yang, C., Disanza, A., Boczkowska, M., Madasu, Y., Scita, G., Svitkina, T., and Dominguez, R. (2014). Mechanism of IRSp53 inhibition and combinatorial activation by Cdc42 and downstream effectors. *Nat Struct Mol Biol* 21, 413-422.

Kaufmann, S., Weiss, I.M., Eckstein, V., and Tanaka, M. (2012). Functional expression of Ca(2)(+) dependent mammalian transmembrane gap junction protein Cx43 in slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Biochem Biophys Res Commun* 419, 165-169.

Kazan, J.M., El-Saghir, J., Saliba, J., Shaito, A., Jalalettine, N., El-Hajjar, L., Al-Ghadban, S., Yehia, L., Zibara, K., and El-Sabban, M. (2019). Cx43 Expression Correlates with Breast Cancer Metastasis in MDA-MB-231 Cells In Vitro, In a Mouse Xenograft Model and in Human Breast Cancer Tissues. *Cancers (Basel)* 11.

King, T.J., and Lampe, P.D. (2005). Temporal regulation of connexin phosphorylation in embryonic and adult tissues. *Biochimica et biophysica acta* 1719, 24-35.

Kjenseth, A., Fykerud, T.A., Sirnes, S., Bruun, J., Yohannes, Z., Kolberg, M., Omori, Y., Rivedal, E., and Leithe, E. (2012). The gap junction channel protein connexin 43 is covalently modified and regulated by SUMOylation. *J Biol Chem* 287, 15851-15861.

Kraemer, R. (2000). Regulation of cell migration in atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep* 2, 445-452.

Krause, M., Dent, E.W., Bear, J.E., Loureiro, J.J., and Gertler, F.B. (2003). Ena/VASP proteins: regulators of the actin cytoskeleton and cell migration. *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 541-564.

Krause, M., Leslie, J.D., Stewart, M., Lafuente, E.M., Valderrama, F., Jagannathan, R., Strasser, G.A., Robinson, D.A., Liu, H., Way, M., *et al.* (2004). Lamellipodin, an Ena/VASP ligand, is implicated in the regulation of lamellipodial dynamics. *Developmental cell* 7, 571-583.

Kumar, N.M., and Gilula, N.B. (1996). The gap junction communication channel. *Cell* 84, 381-388.

Kurokawa, K., Itoh, R.E., Yoshizaki, H., Nakamura, Y.O., and Matsuda, M. (2004). Coactivation of Rac1 and Cdc42 at lamellipodia and membrane ruffles induced by epidermal growth factor. *Molecular biology of the cell* 15, 1003-1010.

Laird, D.W. (2005). Connexin phosphorylation as a regulatory event linked to gap junction internalization and degradation. *Biochimica et biophysica acta* 1711, 172-182.

Laird, D.W. (2006). Life cycle of connexins in health and disease. *Biochem J* 394, 527-543.

Laird, D.W. (2010). The gap junction proteome and its relationship to disease. *Trends Cell Biol* 20, 92-101.

Laird, D.W., and Revel, J.P. (1990). Biochemical and immunochemical analysis of the arrangement of connexin43 in rat heart gap junction membranes. *Journal of cell science* 97 (Pt 1), 109-117.

Lamallice, L., Le Boeuf, F., and Huot, J. (2007). Endothelial cell migration during angiogenesis. *Circ Res* 100, 782-794.

Lamiche, C., Clarhaut, J., Strale, P.O., Crespín, S., Pedretti, N., Bernard, F.X., Naus, C.C., Chen, V.C., Foster, L.J., Defamie, N., *et al.* (2012). The gap junction protein Cx43 is involved in the bone-targeted metastatic behaviour of human prostate cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 29, 111-122.

Langlois, S., Cowan, K.N., Shao, Q., Cowan, B.J., and Laird, D.W. (2008). Caveolin-1 and -2 interact with connexin43 and regulate gap junctional intercellular communication in keratinocytes. *Molecular biology of the cell* 19, 912-928.

Lauf, U., Giepmans, B.N., Lopez, P., Braconnot, S., Chen, S.C., and Falk, M.M. (2002). Dynamic trafficking and delivery of connexons to the plasma membrane and accretion to gap junctions in living cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10446-10451.

Le Clainche, C., and Carlier, M.F. (2008). Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration. *Physiol Rev* 88, 489-513.

Leijnse, N., Oddershede, L.B., and Bendix, P.M. (2015). An updated look at actin dynamics in filopodia. *Cytoskeleton (Hoboken)* 72, 71-79.

Leithe, E., Brech, A., and Rivedal, E. (2006). Endocytic processing of connexin43 gap junctions: a morphological study. *Biochem J* 393, 59-67.

Leithe, E., Mesnil, M., and Aasen, T. (2018). The connexin 43 C-terminus: A tail of many tales. *Biochimica et biophysica acta* 1860, 48-64.

Lesueur, F., Mesnil, M., Delouvee, A., Girault, J.M., Yamasaki, H., Thiery, J.P., and Jouanneau, J. (2002). NBT-II carcinoma behaviour is not dependent on cell-cell communication through gap junctions. *Biochem Biophys Res Commun* 294, 108-115.

- Leykauf, K., Salek, M., Bomke, J., Frech, M., Lehmann, W.D., Durst, M., and Alonso, A. (2006). Ubiquitin protein ligase Nedd4 binds to connexin43 by a phosphorylation-modulated process. *Journal of cell science* 119, 3634-3642.
- Li, H., Spagnol, G., Zheng, L., Stauch, K.L., and Sorgen, P.L. (2016). Regulation of Connexin43 Function and Expression by Tyrosine Kinase 2. *J Biol Chem* 291, 15867-15880.
- Lim, C.J., Kain, K.H., Tkachenko, E., Goldfinger, L.E., Gutierrez, E., Allen, M.D., Groisman, A., Zhang, J., and Ginsberg, M.H. (2008a). Integrin-mediated protein kinase A activation at the leading edge of migrating cells. *Molecular biology of the cell* 19, 4930-4941.
- Lim, K.B., Bu, W., Goh, W.I., Koh, E., Ong, S.H., Pawson, T., Sudhaharan, T., and Ahmed, S. (2008b). The Cdc42 effector IRSp53 generates filopodia by coupling membrane protrusion with actin dynamics. *J Biol Chem* 283, 20454-20472.
- Lin, J.H., Takano, T., Cotrina, M.L., Arcuino, G., Kang, J., Liu, S., Gao, Q., Jiang, L., Li, F., Lichtenberg-Frate, H., *et al.* (2002). Connexin 43 enhances the adhesivity and mediates the invasion of malignant glioma cells. *J Neurosci* 22, 4302-4311.
- Lin, R., Martyn, K.D., Guyette, C.V., Lau, A.F., and Warn-Cramer, B.J. (2006). v-Src tyrosine phosphorylation of connexin43: regulation of gap junction communication and effects on cell transformation. *Cell communication & adhesion* 13, 199-216.
- Lin, R., Warn-Cramer, B.J., Kurata, W.E., and Lau, A.F. (2001). v-Src phosphorylation of connexin 43 on Tyr247 and Tyr265 disrupts gap junctional communication. *The Journal of cell biology* 154, 815-827.
- Lin, W.H., Nelson, S.E., Hollingsworth, R.J., and Chung, C.Y. (2010). Functional roles of VASP phosphorylation in the regulation of chemotaxis and osmotic stress response. *Cytoskeleton (Hoboken)* 67, 259-271.
- Lo, C.W., Waldo, K.L., and Kirby, M.L. (1999). Gap junction communication and the modulation of cardiac neural crest cells. *Trends Cardiovasc Med* 9, 63-69.
- Locke, D., Bian, S., Li, H., and Harris, A.L. (2009). Post-translational modifications of connexin26 revealed by mass spectrometry. *Biochem J* 424, 385-398.
- Lowery, L.A., and Van Vactor, D. (2009). The trip of the tip: understanding the growth cone machinery. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 332-343.
- Lua, B.L., and Low, B.C. (2005). Cortactin phosphorylation as a switch for actin cytoskeletal network and cell dynamics control. *FEBS Lett* 579, 577-585.
- Luster, A.D., Alon, R., and von Andrian, U.H. (2005). Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol* 6, 1182-1190.
- Mak, M., Spill, F., Kamm, R.D., and Zaman, M.H. (2016). Single-Cell Migration in Complex Microenvironments: Mechanics and Signaling Dynamics. *J Biomech Eng* 138, 021004.
- Makowski, L., Caspar, D.L., Phillips, W.C., and Goodenough, D.A. (1977). Gap junction structures. II. Analysis of the x-ray diffraction data. *The Journal of cell biology* 74, 629-645.

- Martins-Marques, T., Anjo, S.I., Pereira, P., Manadas, B., and Girao, H. (2015). Interacting Network of the Gap Junction (GJ) Protein Connexin43 (Cx43) is Modulated by Ischemia and Reperfusion in the Heart. *Mol Cell Proteomics* 14, 3040-3055.
- Matsuuchi, L., and Naus, C.C. (2013). Gap junction proteins on the move: connexins, the cytoskeleton and migration. *Biochimica et biophysica acta* 1828, 94-108.
- Mattila, P.K., and Lappalainen, P. (2008). Filopodia: molecular architecture and cellular functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 446-454.
- McCaffrey, L.M., and Macara, I.G. (2012). Signaling pathways in cell polarity. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.
- Mellor, H. (2004). Cell motility: Golgi signalling shapes up to ship out. *Curr Biol* 14, R434-435.
- Miki, H., and Takenawa, T. (2002). WAVE2 serves a functional partner of IRSp53 by regulating its interaction with Rac. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 93-99.
- Millard, T.H., Bompard, G., Heung, M.Y., Dafforn, T.R., Scott, D.J., Machesky, L.M., and Futterer, K. (2005). Structural basis of filopodia formation induced by the IRSp53/MIM homology domain of human IRSp53. *EMBO J* 24, 240-250.
- Millarte, V., and Farhan, H. (2012). The Golgi in cell migration: regulation by signal transduction and its implications for cancer cell metastasis. *ScientificWorldJournal* 2012, 498278.
- Mo, G.C., Ross, B., Hertel, F., Manna, P., Yang, X., Greenwald, E., Booth, C., Plummer, A.M., Tenner, B., Chen, Z., *et al.* (2017). Genetically encoded biosensors for visualizing live-cell biochemical activity at super-resolution. *Nat Methods* 14, 427-434.
- Moller, J., Luhmann, T., Chabria, M., Hall, H., and Vogel, V. (2013). Macrophages lift off surface-bound bacteria using a filopodium-lamellipodium hook-and-shovel mechanism. *Sci Rep* 3, 2884.
- Morton, D.M., and Tchao, R. (1994). Regulation of motility and cytoskeletal organization of rat bladder carcinoma cells by cyclic AMP. *Cell Motil Cytoskeleton* 29, 375-382.
- Musil, L.S., and Goodenough, D.A. (1993). Multisubunit assembly of an integral plasma membrane channel protein, gap junction connexin43, occurs after exit from the ER. *Cell* 74, 1065-1077.
- Nakagawa, H., Miki, H., Nozumi, M., Takenawa, T., Miyamoto, S., Wehland, J., and Small, J.V. (2003). IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *Journal of cell science* 116, 2577-2583.
- Naus, C.C., and Laird, D.W. (2010). Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* 10, 435-441.
- Neijssen, J., Herberts, C., Drijfhout, J.W., Reits, E., Janssen, L., and Neefjes, J. (2005). Cross-presentation by intercellular peptide transfer through gap junctions. *Nature* 434, 83-88.
- Neijssen, J., Pang, B., and Neefjes, J. (2007). Gap junction-mediated intercellular communication in the immune system. *Prog Biophys Mol Biol* 94, 207-218.

Newell-Litwa, K.A., and Horwitz, A.R. (2011). Cell migration: PKA and RhoA set the pace. *Curr Biol* 21, R596-598.

Nobes, C.D., and Hall, A. (1995). Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* 81, 53-62.

O'Connor, K.L., and Mercurio, A.M. (2001). Protein kinase A regulates Rac and is required for the growth factor-stimulated migration of carcinoma cells. *J Biol Chem* 276, 47895-47900.

Ohta, Y., Akiyama, T., Nishida, E., and Sakai, H. (1987). Protein kinase C and cAMP-dependent protein kinase induce opposite effects on actin polymerizability. *FEBS Lett* 222, 305-310.

Oliveira, R., Christov, C., Guillamo, J.S., de Bouard, S., Palfi, S., Venance, L., Tardy, M., and Peschanski, M. (2005). Contribution of gap junctional communication between tumor cells and astroglia to the invasion of the brain parenchyma by human glioblastomas. *BMC Cell Biol* 6, 7.

Oyamada, M., Oyamada, Y., and Takamatsu, T. (2005). Regulation of connexin expression. *Biochimica et biophysica acta* 1719, 6-23.

Park, D.J., Wallick, C.J., Martyn, K.D., Lau, A.F., Jin, C., and Warn-Cramer, B.J. (2007). Akt phosphorylates Connexin43 on Ser373, a "mode-1" binding site for 14-3-3. *Cell communication & adhesion* 14, 211-226.

Paulson, A.F., Lampe, P.D., Meyer, R.A., TenBroek, E., Atkinson, M.M., Walseth, T.F., and Johnson, R.G. (2000). Cyclic AMP and LDL trigger a rapid enhancement in gap junction assembly through a stimulation of connexin trafficking. *Journal of cell science* 113 (Pt 17), 3037-3049.

Paulucci-Holthauzen, A.A., Vergara, L.A., Bellot, L.J., Canton, D., Scott, J.D., and O'Connor, K.L. (2009). Spatial distribution of protein kinase A activity during cell migration is mediated by A-kinase anchoring protein AKAP Lbc. *J Biol Chem* 284, 5956-5967.

Paznekas, W.A., Boyadjiev, S.A., Shapiro, R.E., Daniels, O., Wollnik, B., Keegan, C.E., Innis, J.W., Dinulos, M.B., Christian, C., Hannibal, M.C., *et al.* (2003). Connexin 43 (GJA1) mutations cause the pleiotropic phenotype of oculodentodigital dysplasia. *Am J Hum Genet* 72, 408-418.

Pepper, M.S., Montesano, R., el Aoumari, A., Gros, D., Orci, L., and Meda, P. (1992). Coupling and connexin 43 expression in microvascular and large vessel endothelial cells. *Am J Physiol* 262, C1246-1257.

Peracchia, C. (2004). Chemical gating of gap junction channels; roles of calcium, pH and calmodulin. *Biochimica et biophysica acta* 1662, 61-80.

Perkins, G., Goodenough, D., and Sosinsky, G. (1997). Three-dimensional structure of the gap junction connexon. *Biophysical journal* 72, 533-544.

Pidoux, G., Gerbaud, P., Dompierre, J., Lygren, B., Solstad, T., Evain-Brion, D., and Tasken, K. (2014). A PKA-ezrin-Cx43 signaling complex controls gap junction communication and thereby trophoblast cell fusion. *Journal of cell science* 127, 4172-4185.

- Pidoux, G., and Tasken, K. (2015). Anchored PKA as a gatekeeper for gap junctions. *Commun Integr Biol* 8, e1057361.
- Plopper, G.E., Huff, J.L., Rust, W.L., Schwartz, M.A., and Quaranta, V. (2000). Antibody-induced activation of beta1 integrin receptors stimulates cAMP-dependent migration of breast cells on laminin-5. *Mol Cell Biol Res Commun* 4, 129-135.
- Pogoda, K., Kameritsch, P., Retamal, M.A., and Vega, J.L. (2016). Regulation of gap junction channels and hemichannels by phosphorylation and redox changes: a revision. *BMC Cell Biol* 17 Suppl 1, 11.
- Pollard, T.D., and Borisy, G.G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Rahman, S., and Evans, W.H. (1991). Topography of connexin32 in rat liver gap junctions. Evidence for an intramolecular disulphide linkage connecting the two extracellular peptide loops. *Journal of cell science* 100 (Pt 3), 567-578.
- Rakib, M.A., Kim, Y.S., Jang, W.J., Choi, B.D., Kim, J.O., Kong, I.K., and Ha, Y.L. (2010). Attenuation of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced gap junctional intercellular communication (GJIC) inhibition in MCF-10A cells by c9,t11-conjugated linoleic acid. *J Agric Food Chem* 58, 12022-12030.
- Reaume, A.G., de Sousa, P.A., Kulkarni, S., Langille, B.L., Zhu, D., Davies, T.C., Juneja, S.C., Kidder, G.M., and Rossant, J. (1995). Cardiac malformation in neonatal mice lacking connexin43. *Science* 267, 1831-1834.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1995). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *EMBO J* 14, 1583-1589.
- Reinhard, M., Halbrugge, M., Scheer, U., Wiegand, C., Jockusch, B.M., and Walter, U. (1992). The 46/50 kDa phosphoprotein VASP purified from human platelets is a novel protein associated with actin filaments and focal contacts. *EMBO J* 11, 2063-2070.
- Ren, R., Mayer, B.J., Cicchetti, P., and Baltimore, D. (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 259, 1157-1161.
- Ridley, A.J. (2015). Rho GTPase signalling in cell migration. *Curr Opin Cell Biol* 36, 103-112.
- Ridley, A.J., Schwartz, M.A., Burridge, K., Firtel, R.A., Ginsberg, M.H., Borisy, G., Parsons, J.T., and Horwitz, A.R. (2003). Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 302, 1704-1709.
- Roskoski, R., Jr. (2015). Src protein-tyrosine kinase structure, mechanism, and small molecule inhibitors. *Pharmacol Res* 94, 9-25.
- Rottner, K., Behrendt, B., Small, J.V., and Wehland, J. (1999). VASP dynamics during lamellipodia protrusion. *Nat Cell Biol* 1, 321-322.
- Saarikangas, J., Zhao, H., Pykalainen, A., Laurinmaki, P., Mattila, P.K., Kinnunen, P.K., Butcher, S.J., and Lappalainen, P. (2009). Molecular mechanisms of membrane deformation by I-BAR domain proteins. *Curr Biol* 19, 95-107.

Saez, J.C., Schalper, K.A., Retamal, M.A., Orellana, J.A., Shoji, K.F., and Bennett, M.V. (2010). Cell membrane permeabilization via connexin hemichannels in living and dying cells. *Experimental cell research* 316, 2377-2389.

Saidi Brikci-Nigassa, A., Clement, M.J., Ha-Duong, T., Adjadj, E., Ziani, L., Pastre, D., Curmi, P.A., and Savarin, P. (2012). Phosphorylation controls the interaction of the connexin43 C-terminal domain with tubulin and microtubules. *Biochemistry* 51, 4331-4342.

Salat-Canela, C., Sese, M., Peula, C., Ramon y Cajal, S., and Aasen, T. (2014). Internal translation of the connexin 43 transcript. *Cell Commun Signal* 12, 31.

Sambrook, J.R., D. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sanchez-Alvarez, R., Paino, T., Herrero-Gonzalez, S., Medina, J.M., and Tabernero, A. (2006). Tolbutamide reduces glioma cell proliferation by increasing connexin43, which promotes the up-regulation of p21 and p27 and subsequent changes in retinoblastoma phosphorylation. *Glia* 54, 125-134.

Sanders, T.A., Llagostera, E., and Barna, M. (2013). Specialized filopodia direct long-range transport of SHH during vertebrate tissue patterning. *Nature* 497, 628-632.

Scita, G., Confalonieri, S., Lappalainen, P., and Suetsugu, S. (2008). IRSp53: crossing the road of membrane and actin dynamics in the formation of membrane protrusions. *Trends Cell Biol* 18, 52-60.

Segretain, D., and Falk, M.M. (2004). Regulation of connexin biosynthesis, assembly, gap junction formation, and removal. *Biochimica et biophysica acta* 1662, 3-21.

Severs, N.J. (1994). Pathophysiology of gap junctions in heart disease. *J Cardiovasc Electrophysiol* 5, 462-475.

Shabb, J.B. (2001). Physiological substrates of cAMP-dependent protein kinase. *Chem Rev* 101, 2381-2411.

Shah, M.M., Martinez, A.M., and Fletcher, W.H. (2002). The connexin43 gap junction protein is phosphorylated by protein kinase A and protein kinase C: in vivo and in vitro studies. *Mol Cell Biochem* 238, 57-68.

Shao, Q., Wang, H., McLachlan, E., Veitch, G.I., and Laird, D.W. (2005). Down-regulation of Cx43 by retroviral delivery of small interfering RNA promotes an aggressive breast cancer cell phenotype. *Cancer Res* 65, 2705-2711.

Shaw, R.M., Fay, A.J., Puthenveedu, M.A., von Zastrow, M., Jan, Y.N., and Jan, L.Y. (2007). Microtubule plus-end-tracking proteins target gap junctions directly from the cell interior to adherens junctions. *Cell* 128, 547-560.

Siushansian, R., Bechberger, J.F., Cechetto, D.F., Hachinski, V.C., and Naus, C.C. (2001). Connexin43 null mutation increases infarct size after stroke. *J Comp Neurol* 440, 387-394.

Skoble, J., Auerbuch, V., Goley, E.D., Welch, M.D., and Portnoy, D.A. (2001). Pivotal role of VASP in Arp2/3 complex-mediated actin nucleation, actin branch-formation, and *Listeria monocytogenes* motility. *The Journal of cell biology* 155, 89-100.

- Smolenski, A., Bachmann, C., Reinhard, K., Honig-Liedl, P., Jarchau, T., Hoschuetzky, H., and Walter, U. (1998). Analysis and regulation of vasodilator-stimulated phosphoprotein serine 239 phosphorylation in vitro and in intact cells using a phosphospecific monoclonal antibody. *J Biol Chem* 273, 20029-20035.
- Smyth, J.W., and Shaw, R.M. (2013). Autoregulation of connexin43 gap junction formation by internally translated isoforms. *Cell Rep* 5, 611-618.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2003). An update on connexin genes and their nomenclature in mouse and man. *Cell communication & adhesion* 10, 173-180.
- Söhl, G., and Willecke, K. (2004). Gap junctions and the connexin protein family. *Cardiovasc Res* 62, 228-232.
- Solan, J.L., Hingorani, S.R., and Lampe, P.D. (2012). Changes in connexin43 expression and localization during pancreatic cancer progression. *J Membr Biol* 245, 255-262.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2009). Connexin43 phosphorylation: structural changes and biological effects. *Biochem J* 419, 261-272.
- Solan, J.L., and Lampe, P.D. (2014). Specific Cx43 phosphorylation events regulate gap junction turnover in vivo. *FEBS Lett* 588, 1423-1429.
- Songyang, Z., Shoelson, S.E., Chaudhuri, M., Gish, G., Pawson, T., Haser, W.G., King, F., Roberts, T., Ratnofsky, S., Lechleider, R.J., *et al.* (1993). SH2 domains recognize specific phosphopeptide sequences. *Cell* 72, 767-778.
- Sorgen, P.L., Trease, A.J., Spagnol, G., Delmar, M., and Nielsen, M.S. (2018). Protein(-)Protein Interactions with Connexin 43: Regulation and Function. *Int J Mol Sci* 19.
- Sosinsky, G.E., Solan, J.L., Gaietta, G.M., Ngan, L., Lee, G.J., Mackey, M.R., and Lampe, P.D. (2007). The C-terminus of connexin43 adopts different conformations in the Golgi and gap junction as detected with structure-specific antibodies. *Biochem J* 408, 375-385.
- Spray, D.C., White, R.L., Mazet, F., and Bennett, M.V. (1985). Regulation of gap junctional conductance. *Am J Physiol* 248, H753-764.
- Squecco, R., Sassoli, C., Nuti, F., Martinesi, M., Chellini, F., Nosi, D., Zecchi-Orlandini, S., Francini, F., Formigli, L., and Meacci, E. (2006). Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function. *Molecular biology of the cell* 17, 4896-4910.
- Steffen, A., Faix, J., Resch, G.P., Linkner, J., Wehland, J., Small, J.V., Rottner, K., and Stradal, T.E. (2006). Filopodia formation in the absence of functional WAVE- and Arp2/3-complexes. *Molecular biology of the cell* 17, 2581-2591.
- Stoletov, K., Strnadel, J., Zardoujian, E., Momiyama, M., Park, F.D., Kelber, J.A., Pizzo, D.P., Hoffman, R., VandenBerg, S.R., and Klemke, R.L. (2013). Role of connexins in metastatic breast cancer and melanoma brain colonization. *Journal of cell science* 126, 904-913.
- Straub, A.C., Billaud, M., Johnstone, S.R., Best, A.K., Yemen, S., Dwyer, S.T., Looft-Wilson, R., Lysiak, J.J., Gaston, B., Palmer, L., *et al.* (2011). Compartmentalized connexin 43 s-nitrosylation/denitrosylation regulates heterocellular communication in the vessel wall. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 31, 399-407.

- Sun, Y., Zhao, X., Yao, Y., Qi, X., Yuan, Y., and Hu, Y. (2012). Connexin 43 interacts with Bax to regulate apoptosis of pancreatic cancer through a gap junction-independent pathway. *Int J Oncol* 41, 941-948.
- Tasken, K., and Aandahl, E.M. (2004). Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev* 84, 137-167.
- TenBroek, E.M., Lampe, P.D., Solan, J.L., Reynhout, J.K., and Johnson, R.G. (2001). Ser364 of connexin43 and the upregulation of gap junction assembly by cAMP. *The Journal of cell biology* 155, 1307-1318.
- Thevenin, A.F., Kowal, T.J., Fong, J.T., Kells, R.M., Fisher, C.G., and Falk, M.M. (2013). Proteins and mechanisms regulating gap-junction assembly, internalization, and degradation. *Physiology (Bethesda)* 28, 93-116.
- Thomas, S.M., and Brugge, J.S. (1997). Cellular functions regulated by Src family kinases. *Annu Rev Cell Dev Biol* 13, 513-609.
- Toyofuku, T., Yabuki, M., Otsu, K., Kuzuya, T., Hori, M., and Tada, M. (1998). Direct association of the gap junction protein connexin-43 with ZO-1 in cardiac myocytes. *J Biol Chem* 273, 12725-12731.
- Vaggi, F., Disanza, A., Milanese, F., Di Fiore, P.P., Menna, E., Matteoli, M., Gov, N.S., Scita, G., and Ciliberto, A. (2011). The Eps8/IRSp53/VASP network differentially controls actin capping and bundling in filopodia formation. *PLoS Comput Biol* 7, e1002088.
- Valiunas, V., Polosina, Y.Y., Miller, H., Potapova, I.A., Valiuniene, L., Doronin, S., Mathias, R.T., Robinson, R.B., Rosen, M.R., Cohen, I.S., *et al.* (2005). Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *The Journal of physiology* 568, 459-468.
- van Steensel, M.A., Spruijt, L., van der Burgt, I., Bladergroen, R.S., Vermeer, M., Steijlen, P.M., and van Geel, M. (2005). A 2-bp deletion in the GJA1 gene is associated with oculodento-digital dysplasia with palmoplantar keratoderma. *Am J Med Genet A* 132A, 171-174.
- van Veen, A.A., van Rijen, H.V., and Opthof, T. (2001). Cardiac gap junction channels: modulation of expression and channel properties. *Cardiovasc Res* 51, 217-229.
- Vasioukhin, V., Bauer, C., Yin, M., and Fuchs, E. (2000). Directed actin polymerization is the driving force for epithelial cell-cell adhesion. *Cell* 100, 209-219.
- Walders-Harbeck, B., Khaitlina, S.Y., Hinssen, H., Jockusch, B.M., and Illenberger, S. (2002). The vasodilator-stimulated phosphoprotein promotes actin polymerisation through direct binding to monomeric actin. *FEBS Lett* 529, 275-280.
- Wall, M.E., Otey, C., Qi, J., and Banes, A.J. (2007). Connexin 43 is localized with actin in tenocytes. *Cell Motil Cytoskeleton* 64, 121-130.
- Wang, C.M., Lincoln, J., Cook, J.E., and Becker, D.L. (2007). Abnormal connexin expression underlies delayed wound healing in diabetic skin. *Diabetes* 56, 2809-2817.
- Wang, J.T., Song, L.Z., Li, L.L., Zhang, W., Chai, X.J., An, L., Chen, S.L., Frotscher, M., and Zhao, S.T. (2015). Src controls neuronal migration by regulating the activity of FAK and cofilin. *Neuroscience* 292, 90-100.

- Weaver, A.M., Karginov, A.V., Kinley, A.W., Weed, S.A., Li, Y., Parsons, J.T., and Cooper, J.A. (2001). Cortactin promotes and stabilizes Arp2/3-induced actin filament network formation. *Curr Biol* 11, 370-374.
- Webb, D.J., Donais, K., Whitmore, L.A., Thomas, S.M., Turner, C.E., Parsons, J.T., and Horwitz, A.F. (2004). FAK-Src signalling through paxillin, ERK and MLCK regulates adhesion disassembly. *Nat Cell Biol* 6, 154-161.
- Wei, C.J., Francis, R., Xu, X., and Lo, C.W. (2005). Connexin43 associated with an N-cadherin-containing multiprotein complex is required for gap junction formation in NIH3T3 cells. *J Biol Chem* 280, 19925-19936.
- White, T.W., Paul, D.L., Goodenough, D.A., and Bruzzone, R. (1995). Functional analysis of selective interactions among rodent connexins. *Molecular biology of the cell* 6, 459-470.
- Willecke, K., Eiberger, J., Degen, J., Eckardt, D., Romualdi, A., Guldenagel, M., Deutsch, U., and Sohl, G. (2002). Structural and functional diversity of connexin genes in the mouse and human genome. *Biological chemistry* 383, 725-737.
- Wong, W., and Scott, J.D. (2004). AKAP signalling complexes: focal points in space and time. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 959-970.
- Wu, H., and Parsons, J.T. (1993). Cortactin, an 80/85-kilodalton pp60src substrate, is a filamentous actin-binding protein enriched in the cell cortex. *The Journal of cell biology* 120, 1417-1426.
- Xu, X., Francis, R., Wei, C.J., Linask, K.L., and Lo, C.W. (2006). Connexin 43-mediated modulation of polarized cell movement and the directional migration of cardiac neural crest cells. *Development* 133, 3629-3639.
- Yamane, Y., Shiga, H., Asou, H., Haga, H., Kawabata, K., Abe, K., and Ito, E. (1999). Dynamics of astrocyte adhesion as analyzed by a combination of atomic force microscopy and immuno-cytochemistry: the involvement of actin filaments and connexin 43 in the early stage of adhesion. *Arch Histol Cytol* 62, 355-361.
- Yogo, K., Ogawa, T., Akiyama, M., Ishida-Kitagawa, N., Sasada, H., Sato, E., and Takeya, T. (2006). PKA implicated in the phosphorylation of Cx43 induced by stimulation with FSH in rat granulosa cells. *J Reprod Dev* 52, 321-328.
- Yogo, K., Ogawa, T., Akiyama, M., Ishida, N., and Takeya, T. (2002). Identification and functional analysis of novel phosphorylation sites in Cx43 in rat primary granulosa cells. *FEBS Lett* 531, 132-136.
- Zheng, L., Li, H., Cannon, A., Trease, A.J., Spagnol, G., Zheng, H., Radio, S., Patel, K., Batra, S., and Sorgen, P.L. (2019). Phosphorylation of Cx43 residue Y313 by Src contributes to blocking the interaction with Drebrin and disassembling gap junctions. *J Mol Cell Cardiol* 126, 36-49.

Publikationen und Konferenzbeiträge

Publikationen: Kameritsch P*, **Kiemer F***, Mannell H, Beck H, Pohl U, Pogoda K. PKA negatively modulates the migration enhancing effect of Connexin 43. *Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research*. 2019 May; 1866(5):828-838
* geteilte Erstautorenschaft

Kameritsch P, **Kiemer F**, Beck H, Pohl U, Pogoda K. Cx43 increases serum induced filopodia formation via activation of p21-activated protein kinase 1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*. 2015 Nov; 1853 (11 A): 2907-2917

Kolinko S, Wanner G, Katzmann E, **Kiemer F**, M Fuchs B, Schüler D. Clone libraries and single cell genome amplification reveal extended diversity of uncultivated magnetotactic bacteria from marine and freshwater environments. *Environmental Microbiology*. 2013 May;15(5):1290-1301

Konferenzen: Deutsche Physiologische Gesellschaft; 16.-18.03.2017, Greifswald;
Vortrag: PKA modulates the migration enhancing effect of Connexin 43 in a negative manner

Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie; 26.-28.09.2016, Frankfurt;
Posterpräsentation: The migration enhancing effect of Connexin 43 can be negatively modulated by PKA

Deutsche Physiologische Gesellschaft; 03.-05.03.2016, Lübeck; Posterpräsentation: PKA dependent phosphorylation of the C-terminal part of Cx43 reduces cell migration

Deutsche Physiologische Gesellschaft; 05.-07.03.2015, Magdeburg;
Posterpräsentation: The C-terminal SH2/SH3 domains of Connexin 43 are pivotal for its migration enhancing activity

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Pohl für die Möglichkeit meine Doktorarbeit in seinem Labor durchzuführen und seine unermüdliche Unterstützung, die Forschungsarbeit voranzutreiben, bedanken. Größten Dank auch für die anregenden Gespräche und hilfreichen Ideen.

Frau Prof. Dr. Angelika Vollmar danke ich sehr herzlich für die Betreuung als externe Doktorandin und somit für die Möglichkeit zur naturwissenschaftlichen Promotion an der LMU.

Ganz besonders bedanke ich mich bei PD Dr. Kristin Pogoda für die Betreuung während meiner Promotion. Vielen Dank für deine Unterstützung, die Einführung in die wissenschaftlichen Techniken, das Teilen von Wissen, die inspirierenden Gespräche und das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Ein großes Dankeschön an PD Dr. Petra Kameritsch und Silvia Münzing für die Messung der Zell-Zell-Kopplung. Herzlichen Dank an Kasia Stefanowski und Ulrike Wilhelm-Forster für die Einarbeitung im Labor und das gute Arbeitsklima.

Ich bedanke mich auch herzlich bei allen aktuellen und ehemaligen Mitgliedern des Walter-Brendel-Zentrums und BMCs für die freundschaftliche Atmosphäre. Vor allem bei Bettina und Anca für die gute Labornachbarschaft und Bürogemeinschaft, bei Steffi, Stefan, Matthias, Theres und Andreas für die Gespräche und hilfreichen Tipps beim Mittagessen. Außerdem vielen Dank für die schönen gemeinsamen Unternehmungen und Konferenzen. Danke für den guten Zusammenhalt und das angenehme Laborklima.

Von ganzem Herzen bedanke ich mich bei meinen Eltern und meinem Bruder für die seelische Unterstützung während dieser Arbeit. Vielen Dank für euren Rückhalt in allen Lebenslagen! Ich bin so froh, Euch als Familie zu haben.